Ez a dokumentum kizárólag tájékoztató jellegű és nem vált ki joghatást. Az EU intézményei semmiféle felelősséget nem vállalnak a tartalmáért. A jogi aktusoknak – ideértve azok bevezető hivatkozásait és preambulumbekezdéseit is – az Európai Unió Hivatalos Lapjában közzétett és az EUR-Lex portálon megtalálható változatai tekintendők hitelesnek. Az említett hivatalos szövegváltozatok közvetlenül elérhetők az ebben a dokumentumban elhelyezett linkeken keresztül

►B

A BIZOTTSÁG 440/2008/EK RENDELETE

(2008. május 30.)

a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és a tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról

(EGT-vonatkozású szöveg)

(HL L 142., 2008.5.31., 1. o.)

Módosította:

		Hivatalos Lap		
		Szám	Oldal	Dátum
►M1	A Bizottság 761/2009/EK rendelete (2009. július 23.)	L 220	1	2009.8.24.
►M2	A Bizottság 1152/2010/EU rendelete (2010. december 8.)	L 324	13	2010.12.9.
►M3	A Bizottság 640/2012/EU rendelete (2012. július 6.)	L 193	1	2012.7.20.
►M4	A Bizottság 260/2014/EU rendelete (2014. január 24.)	L 81	1	2014.3.19.
►M5	A Bizottság 900/2014/EU rendelete (2014. július 15.)	L 247	1	2014.8.21.
►M6	A Bizottság (EU) 2016/266 rendelete (2015. december 7.)	L 54	1	2016.3.1.
►M7	A Bizottság (EU) 2017/735 rendelete (2017. február 14.)	L 112	1	2017.4.28.
►M8	A Bizottság (EU) 2019/1390 rendelete (2019. július 31.)	L 247	1	2019.9.26.

▼B

A BIZOTTSÁG 440/2008/EK RENDELETE

(2008. május 30.)

a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és a tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról

(EGT-vonatkozású szöveg)

1. cikk

Az 1907/2006/EK rendelet céljából alkalmazandó vizsgálati módszereket e rendelet melléklete állapítja meg.

2. cikk

A Bizottság szükség esetén felülvizsgálja az e rendeletben foglalt vizsgálati módszereket a gerinces állatokon végzett kísérletek helyettesítése, számának csökkentése és finomítása érdekében.

3. cikk

A 67/548/EGK irányelv V. mellékletére történő hivatkozásokat az e rendeletre való hivatkozásként kell értelmezni.

4. cikk

Ez a rendelet az *Európai Unió Hivatalos Lapjában* történő kihirdetését követő napon lép hatályba.

Rendelkezéseit 2008. június 1-jétől kell alkalmazni.

▼B

MELLÉKLET

▼M6

Ha egy vizsgálati módszer leírása nem utal egyértelműen a módszernek a több összetevőből álló anyagok, az ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok (UVCB), illetőleg a keverékek vizsgálatára való alkalmazhatóságára, akkor azt megelőzően, hogy a vizsgálati módszert egy több összetevőből álló anyag, UVCB vagy keverék vizsgálatára alkalmaznánk, meg kell fontolni, hogy a módszer a tervezett szabályozási cél szempontjából megfelelő-e.

Ha a vizsgálati módszert több összetevőből álló anyag, UVCB vagy keverék vizsgálatára alkalmazzuk, akkor – például az összetevők kémiai azonosító adatainak, mennyiségi előfordulásának és releváns jellemzőinek megadásával – a lehetőségekhez mérten elegendő információt kell szolgáltatni az összetételről.

▼B

A. RÉSZ: A FIZIKAI-KÉMIAI TULAJDONSÁGOK MEGHATÁROZÁSÁNAK MÓDSZEREI

TARTALOMJEGYZÉK

A.1. OLVADÁSPONT/FAGYÁSPONT

A.2. FORRÁSPONT

A.3. RELATÍV SŰRŰSÉG

A.4. GŐZNYOMÁS

A.5. FELÜLETI FESZÜLTSÉG

A.6. OLDHATÓSÁG VÍZBEN

A.8. MEGOSZLÁSI HÁNYADOS

A.9. LOBBANÁSPONT

A.10. TŰZVESZÉLYESSÉG (SZILÁRD ANYAGOK)

A.11. TŰZVESZÉLYESSÉG (GÁZOK)

A.12. TŰZVESZÉLYESSÉG (ÉRINTKEZÉS VÍZZEL)

A.13. SZILÁRD ANYAGOK ÉS FOLYADÉKOK ÖNGYULLADÁSI KÉPESSÉGE

A.14. ROBBANÁSI TULAJDONSÁGOK

A.15. ÖNGYULLADÁSI HŐMÉRSÉKLET (FOLYADÉKOK ÉS GÁZOK)

A.16. SZILÁRD ANYAGOK RELATÍV ÖNGYULLADÁSI HŐMÉRSÉKLETE

A.17. OXIDÁLÓ TULAJDONSÁGOK (SZILÁRD ANYAGOK)

A.18. A POLIMEREK SZÁMÁTLAG SZERINTI MOLEKULATÖMEGE ÉS MOLEKULATÖMEG-ELOSZLÁSA

A.19. POLIMEREK KIS MOLEKULATÖMEG-TARTALMA

A.20. POLIMEREK OLDÓDÁS/EXTRAKCIÓ VISELKEDÉSE VÍZBEN

A.21. OXIDÁLÓ TULAJDONSÁGOK (FOLYADÉKOK)

A.22. ROSTOK HOSSZAL SÚLYOZOTT ÁTLAGOS GEOMETRIAI ÁTMÉRŐJE

A.23. MEGOSZLÁSI HÁNYADOS (1-OKTANOL/VÍZ): LASSÚ KEVERÉSES MÓDSZER

A.24. MEGOSZLÁSI HÁNYADOS (N-OKTANOL/VÍZ), NAGY TELJESÍTMÉNYŰ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS (HPLC) MÓDSZER

A.25. DISSZOCIÁCIÓS ÁLLANDÓK A VÍZBEN (TITRÁLÁSI MÓDSZER – SPEKTROFOTOMETRIÁS MÓDSZER – KONDUKTOMETRIÁS MÓDSZER)

▼B

A.1. OLVADÁSPONT/FAGYÁSPONT

1. MÓDSZER

A leírt módszerek többsége az 1. OECD vizsgálati irányelven alapul. Az alapelveket a (2) és (3) szakirodalom ismerteti.

1.1. BEVEZETÉS

Az anyagok olvadáspontjának meghatározásához a leírt módszereket és eszközöket kell alkalmazni az anyagok tisztasági fokára vonatkozó mindenfajta korlátozás nélkül.

A módszer kiválasztása a vizsgálni kívánt anyag természetétől függ. Ennek következtében a korlátozó tényező attól függ, hogy könnyen, nehezen vagy egyáltalán nem porítható az anyag.

Néhány anyag esetében a fagyáspont vagy dermedési pont meghatározása a megfelelőbb, és az ezek meghatározására vonatkozó szabványok is szerepelnek ebben a módszerben.

Ahol az anyag különleges tulajdonságai miatt a fenti paraméterek közül egyik sem mérhető nehézség nélkül, a dermedéspont lehet megfelelő.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Az olvadáspont az a hőmérséklet, amelynél légköri nyomáson létrejön a fázisátmenet a szilárd halmazállapotból folyékony halmazállapotba, és ez a hőmérséklet ideális esetben megegyezik a fagyásponttal.

Mivel sok anyag fázisátmenete bizonyos hőmérséklet-tartományban jön létre, ezért ezt gyakran olvadási tartományként írják le.

Mértékegységek átszámítása (K-ről ^{o}C-ra)

$t = T - 273{,}15$

t: Celsius-skála szerinti hőmérséklet, Celsius-fok (^{o}C)

T: termodinamikai hőmérséklet, Kelvin (K)

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel kapott eredményekkel.

Néhány kalibrációs anyagot a (4) szakirodalom sorol fel.

▼B

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Meghatározza a szilárd halmazállapotból folyékony halmazállapotba vagy folyékony halmazállapotból szilárd halmazállapotba történő fázisátmenet hőmérsékletét (hőmérséklettartományát). A gyakorlatban a vizsgált anyag mintájának légköri nyomáson végrehajtott melegítése/hűtése során az olvadás/fagyás kezdetének és az olvadás/fagyás befejezésének hőmérsékletét határozzák meg. A leírás öt módszert ismertet, nevezetesen a kapilláris módszert, a fűtőasztalos módszereket, a fagyáspont-meghatározásokat, a termikus analízis módszerét és a dermedéspont meghatározását (ahogyan ezt az ásványolajokhoz kifejlesztették).

Bizonyos esetekben megfelelő lehet a fagyáspont mérése az olvadáspont mérése helyett.

1.4.1. **Kapilláris módszer**

1.4.1.1. *Olvadáspontmérő készülékek folyadékfürdővel*

Kis mennyiségű, finomra őrölt anyagot helyeznek el egy kapilláris csőben, és szorosan tömörítik. Ezután felmelegítik a csövet egy hőmérővel együtt, és a hőmérséklet-emelkedést 1 K/perc körüli értéknél kisebbre állítják be a tényleges olvasztás során. Meghatározzák az olvadás kezdő és végső hőmérsékletét.

1.4.1.2. *Olvadáspontmérő készülékek fémblokkos eszközzel*

Megegyezik az 1.4.1.1. pontban ismertetett eljárással, azzal a kivétellel, hogy melegített fémblokkban helyezik el a kapilláris csövet és a hőmérőt, és ezek a blokkban kialakított nyílásokon keresztül figyelhetők.

1.4.1.3. *Fotocellás meghatározás*

A kapilláris csőben elhelyezett mintát automatikusan melegítik egy fémhengerben. Fénysugarat irányítanak az anyagon keresztül a hengerben kialakított nyílás segítségével egy pontosan kalibrált fotocellához. A legtöbb anyag optikai tulajdonságai opálosról átlátszóra változnak a hevítés során. A fotocellát elérő fény intenzitása megnövekszik, és stop jelet küld a digitális jelzőkészüléknek, amely a fűtőkamrában elhelyezett platina ellenállás-hőmérő hőmérsékletét jelzi. Ez a módszer nem alkalmas néhány, erősen színezett anyaghoz.

1.4.2. **Fűtőasztalok**

1.4.2.1. *Kofler-féle fűtőasztal*

A Kofler-féle fűtőasztal két, különböző hővezető képességű, elektromosan melegített fémből áll, ahol a fűtőasztalt úgy tervezték, hogy a hosszúsága mentén a hőmérséklet-gradiens majdnem lineáris legyen. A fűtőasztal hőmérséklete 283-tól 573 K-ig változhat. A fűtőasztalt egy, a fűtőasztalhoz tervezett skálával és mutatót tartalmazó különleges hőmérsékletjelző készülékkel látták el. Az olvadáspont meghatározására az anyagot vékony rétegben közvetlenül a fűtőasztal felületére helyezik. Néhány másodpercen belül éles elválasztó vonal alakul ki a folyékony és szilárd fázis között. Ekkor a mutatót a vonal hátralévő részéhez állítva leolvassák az elválasztó vonalnál kapott hőmérsékletet.

▼B

1.4.2.2. *Olvadásvizsgáló mikroszkóp*

Többféle, mikroszkóppal végrehajtott fűtőasztal-vizsgálat alkalmas a kis mennyiségű anyag olvadáspontjának meghatározására. A fűtőasztalok többségében a hőmérsékletet érzékeny termoelemmel mérik, de esetenként higanyhőmérőt használnak. Egy jellegzetes mikroszkópos, fűtőasztalos olvadáspontvizsgáló-készülék olyan, fémlemezt tartalmazó hevítőkamrával rendelkezik, amelyre a mintát egy tárgylemezen helyezik el. A fémlemez közepén lévő nyílás lehetővé teszi, hogy bejusson a fény a mikroszkóp megvilágító tükréről. Használat közben üveglappal fedik le a kamrát annak érdekében, hogy a vizsgált területről kizárják a levegőt.

A minta hevítését reosztát szabályozza. Optikailag anizotróp anyagokon történő nagyon pontos mérések végrehajtásához polarizált fény használható.

1.4.2.3. *Meniszkusz-módszer*

Ezt a módszert kifejezetten poliamidokhoz használják.

Vizuálisan meghatározzák azt a hőmérsékletet, amelynél egy fűtőasztal és egy, a poliamid próbadarab által tartott üvegfedél közé zárt szilikonolaj meniszkusza elmozdul.

1.4.3. **Fagyáspont meghatározásának módszere**

A mintát speciális kémcsőbe helyezik a fagyáspont meghatározására szolgáló készülékbe. A mintát óvatosan és folyamatosan keverik a hűtés során, és megfelelő időközönként megmérik a hőmérsékletét. Amikor a hőmérséklet néhány leolvasás során állandó marad, ezt a hőmérsékletet jegyzik fel (a hőmérő hibájának figyelembevételével) fagyáspontként.

A túlhűtést a szilárd és a folyékony fázisok közötti egyensúly fenntartásával kell elkerülni.

1.4.4. **Termikus analízis**

1.4.4.1. *Differenciál-termoanalízis (DTA)*

Ez a módszer az anyag és egy referenciaanyag közötti hőmérséklet-különbséget a hőmérséklet függvényében regisztrálja, miközben az anyagot és a referenciaanyagot ugyanazzal az irányított hőmérséklet-programmal vizsgálják. Amikor a minta entalpiaváltozással járó fázisátalakuláson megy keresztül, ezt a változást a hőáramlási görbe alapvonalától való endoterm (olvadás) vagy exoterm (fagyás) eltérés jelzi.

▼B

1.4.4.2. *Differenciál scanning kalorimetria (DSC)*

Ez a módszer egy anyagba és a referenciaanyagba történő energiabevitelek közötti különbséget a hőmérséklet függvényében regisztrálja, miközben az anyagot és a referenciaanyagot ugyanolyan irányított hőmérsékletprogrammal vizsgálják. Ez az energia az anyag és a referenciaanyag közötti nulla hőmérséklet-különbség létrehozásához szükséges energia. Amikor a minta entalpiaváltozással járó fázisátalakuláson megy keresztül, ezt a változást a hőáramlási görbe alapvonalától való endoterm (olvadás) vagy exoterm (fagyás) eltérés jelzi.

1.4.5. **Dermedéspont**

Ezt a módszert ásványolajoknál történő használatra fejlesztették ki, és minden alacsony olvadáspontú, olajtartalmú anyaghoz használható.

Előzetes melegítés után a mintát meghatározott ütemben hűtik, és 3 K hőfokintervallumonként megvizsgálják a folyási jellemzőit. Dermedéspontként azt a legalacsonyabb hőmérsékletet jegyzik fel, amelynél még megfigyelhető az anyag mozgása.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A következő táblázat sorolja fel az olvadáspont/olvadási tartomány meghatározásához használt különböző módszerek alkalmazhatóságát és pontosságát:

TÁBLÁZAT: A MÓDSZEREK ALKALMAZHATÓSÁGA

A. **Kapilláris módszerek**

Mérési módszer	Azok az anyagok, amelyek poríthatók	Azok az anyagok, amelyek nem poríthatók könnyen	Hőmérséklet-tartomány	Becsült pontosság ([1])	Meglévő szabvány
Olvadáspont-mérő készülékek folyadékfürdővel	Igen	Csak néhányhoz	273-tól 573 K-ig	± 0,3K	J1S K 0064
Olvadáspont-mérő készülékek fémblokkal	Igen	Csak néhányhoz	293-tól > 573 K-ig	± 0,5K	ISO 1218 (E)
Fotocellás meghatározás	Igen	Többféle Készülékkel, eszközzel	253-tól 573 K-ig	± 0,5K	

([1]) A készülék típusától és az anyag tisztaságának fokától függ.

▼B

B. **Fűtőasztalok és fagyasztási módszerek**

Mérési módszer	Azok az anyagok, amelyek poríthatók	Azok az anyagok, amelyek nem poríthatók könnyen	Hőmérséklet-tartomány	Becsült pontosság (1)	Meglévő szabvány
Kofler-féle fűtőasztal rúd	Igen	Nem	283-tól > 573 K-ig	± 1,0 K	ANSI/ASTMD 3451-76
Olvadást vizsgáló mikroszkóp	Igen	Csak néhányhoz	273-tól > 573 K-ig	± 0,5K	DIN 53736
Meniszkusz-módszer	Nem	Különösen poliamidokhoz	293-tól > 573 K-ig	± 0,5K	ISO 1218(E)
Fagyáspont meghatározási módszer	Igen	Igen	223-tól 573 K-ig	± 0,5 K	pl. BS 4695

(1) A készülék típusától és az anyag tisztaságának fokától függ.

C. **Termoanalízis**

Mérési módszer	Azok az anyagok, amelyek poríthatók	Azok az anyagok, amelyek nem poríthatók könnyen	Hőmérséklet-tartomány	Becsült pontosság (1)	Meglévő szabvány
Differenciál-termoanalízis	Igen	Igen	173-tól 1 273 K-ig	600 K-ig ± 0,5 K, 1 273 K-ig ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Differenciál scanning kalori-metria	Igen	Igen	173-tól 1 273 K-ig	600 K-ig ± 0,5 K, 1 273 K-ig ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) A készülék típusától és az anyag tisztaságának fokától függ.

D. **Dermedéspont**

Mérési módszer	Azok az anyagok, amelyek poríthatok	Azok az anyagok, amelyek nem poríthatók könnyen	Hőmérséklet-tartomány	Becsült pontosság (1)	Meglévő szabvány
Dermedéspont	Ásványolajokhoz és olajtartalmú anyagokhoz	Ásványola-jokhoz és olaj-tartalmú anya-gokhoz	223-tól 323K-ig	± 3,0 K	ASTM D 97-66

(1) A készülék típusától és az anyag tisztaságának fokától függ.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

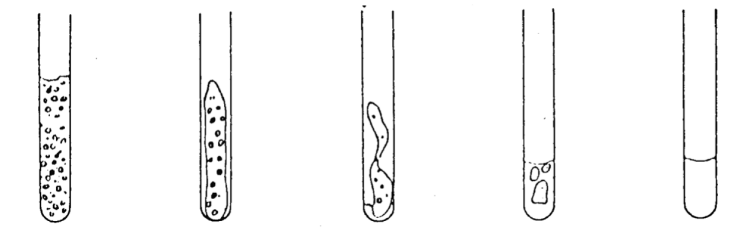
A nemzetközi és nemzeti szabványok csaknem minden vizsgálati módszert leírnak (lásd az 1. függeléket).

1.6.1. **Módszerek kapilláris csővel**

Lassú hőmérséklet-növelés esetén a finom porrá őrölt anyagok rendszerint az 1. ábrán látható olvadási szakaszokat mutatják.

▼B

1. ábra



A. szakasz (Az olvadás kezdete): finom cseppecskék egyenletesen tapadnak a kapilláris cső belső falához.

B. szakasz Térköz jelenik meg a minta és a belső fal között az olvadt anyag zsugorodása miatt.

C. szakasz Az összezsugorodott minta kezd összeesni és cseppfolyósodni.

D. szakasz Teljes meniszkusz jön létre a felületen, de a minta észlelhető mennyisége szilárd marad.

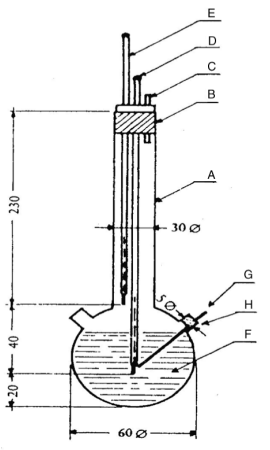
E. szakasz (Az olvadás végső szakasza): nincsenek szilárd részecskék.

Az olvadáspont meghatározása során az olvadás kezdeti és végső hőmérsékletét jegyzik fel.

1.6.1.1. *Olvadáspontmérő folyadékfürdő készülék*

A 2. ábra egy szabványosított, üvegből készített olvadáspontmérő készüléktípust (JIS K 0064) mutat; minden méret milliméterben van megadva.

2. ábra



A: Mérőedény
B: Dugó
C: Szellőzőnyílás
D: Hőmérő
E: Segédhőmérő
F: Fürdőfolyadék
G: 80–100 mm hosszúságú, 1,0 ± 0,2 mm belső átmérőjű, 0,2–0,3 mm falvastagságú, üvegből készült kapilláris cső
H: Oldalcső

▼B

Fürdőfolyadék:

Megfelelő folyadékot kell választani. A folyadék kiválasztása a meghatározni kívánt olvadásponttól függ, például 473 K-nél nem magasabb olvadáspontokhoz folyékony paraffin, 573 K-nél nem magasabb olvadáspontokhoz szilikonolaj alkalmas.

523 K feletti olvadáspontokhoz három tömegrész kénsavból és két tömegrész káliumszulfátból álló keverék használható. Ennek használata esetén megfelelő óvintézkedéseket kell tenni.

Hőmérő:

Csak azok a hőmérők használhatók, amelyek megfelelnek az alábbi, vagy ezzel egyenértékű szabványok követelményeinek:

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

Eljárás:

A száraz anyagot dörzscsészében finom porrá őrlik, és behelyezik az egyik végén leforrasztott kapilláris csőbe úgy, hogy a töltési szint körülbelül 3 mm legyen szoros összetömörítés után. Az egységes tömörített minta eléréséhez a kapilláris csövet függőlegesen, üvegcsövön keresztül óraüvegre kell ejteni körülbelül 700 mm magasságból.

A megtöltött kapilláris csövet úgy kell a fürdőbe helyezni, hogy a hőmérő higanygömbjének középső része azon a helyen érintkezzen a kapilláris csővel, ahol az anyag található. A kapilláris csövet általában az olvadási hőmérsékletnél 10 K-nel alacsonyabb hőmérséklet mellett helyezik a készülékbe.

A folyadékfürdőt úgy melegítik, hogy a hőmérséklet-növekedés mértéke körülbelül 3 K/perc legyen. A folyadékot keverni kell. Körülbelül 10 K-nel a várt olvadáspont előtt a hőmérsékletnövekedési ütemet maximum 1 K/perc értékre kell módosítani.

Számítás:

Az olvadáspont számítása a következőképpen történik:

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

Ahol:

T = korrigált olvadáspont K-ben

T_D = a D hőmérő által mutatott hőmérsékletérték K-ben

T_E = az E hőmérő által mutatott hőmérsékletérték K-ben

N = a D hőmérőn a folyadékfürdőből kiemelkedő részen a higanyoszlop fokbeosztásainak száma

1.6.1.2. *Olvadáspontmérő készülékek fémblokkal*

Készülék:

A következőkből áll:

— hengeres fémblokk, amelynek a belső része üreges és kamrát alkot (lásd a 3. ábrát),

— fémdugó, két vagy több furattal, amelynek segítségével csövek vezethetők a fémblokkba,

▼B

— egy, a fémblokkhoz létrehozott fűtőrendszer, amelyet például a fémblokkhoz csatolt, zárt elektromos ellenállás biztosít,

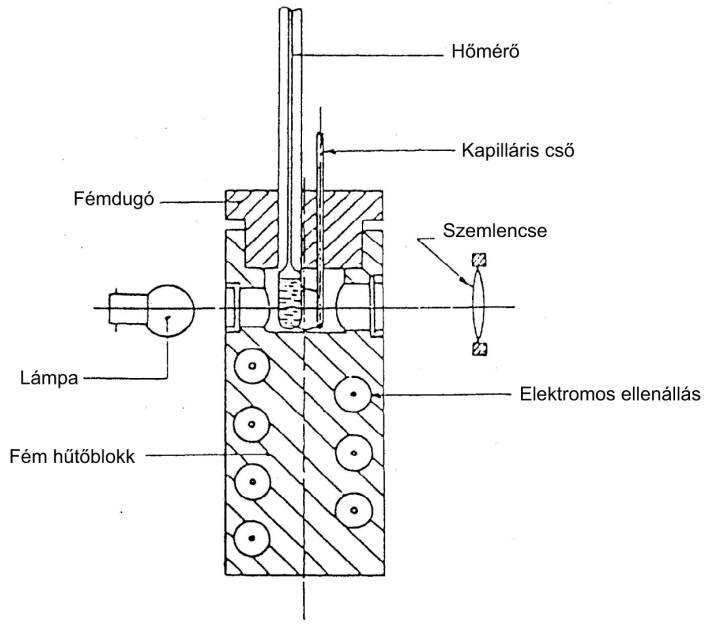
— reosztát az energiabevitel szabályozásához, elektromos fűtés használatakor,

— a kamra oldalfalain négy, hőálló üvegből készült ablak, egymással szemben, derékszögben elhelyezve. Az egyik ablak elé nézőkét szereltek fel a kapilláris cső megfigyeléséhez. A többi három ablakot lámpák segítségével a burkolat belsejének megvilágítására használják,

— egyik végén zárt, hőálló üvegből készült kapilláris cső (lásd az 1.6.1.1. pontot).

Lásd az 1.6.1.1. pontban említett szabványokat. Hasonló pontosságú termoelektromos mérőkészülékek is alkalmazhatók.

3. ábra



1.6.1.3. *Fotocellás meghatározás*

Készülék és eljárás:

A készülék egy automatikus hűtőrendszerrel ellátott fémkamrából áll. Három kapilláris csövet töltenek meg az 1.6.1.1. pontnak megfelelően, és helyeznek a kemencébe.

▼B

Különböző lineáris hőmérséklet-növelési lehetőségek állnak rendelkezésre a készülék kalibrálásához, az alkalmas hőmérséklet-növekedés beállítása elektromosan történik egy előre kiválasztott konstans és lineáris értékre. Regisztráló készülékek mutatják a kemence tényleges hőmérsékletét és a kapilláris csövekben lévő anyag hőmérsékletét.

1.6.2. **Fűtőasztalok**

1.6.2.1. *Kofler-féle fűtőasztal*

Lásd a függeléket.

1.6.2.2. *Olvadásvizsgáló mikroszkóp*

Lásd a függeléket.

1.6.2.3. *Meniszkusz-módszer (poliamidok)*

Lásd a függeléket.

Az olvadásponton a hevítés sebességének 1 K/perc értéknél kisebbnek kell lennie.

1.6.3. **A fagyáspont meghatározásának módszerei**

Lásd a függeléket.

1.6.4. **Termikus analízis**

1.6.4.1. *Differenciál-termoanalízis*

Lásd a függeléket.

1.6.4.2. *Differenciál scanning kalorimetria*

Lásd a függeléket.

1.6.5. **Dermedéspont meghatározása**

Lásd a függeléket.

2. **ADATOK**

Néhány esetben a hőmérő helyesbítése szükséges.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az alkalmazott módszert,

— az anyag pontos leírását (azonosság és szennyeződések), és amennyiben volt ilyen, előzetes tisztítási fokának pontos ismertetését,

— a pontosság becslését.

Legalább két, a becsült pontossági tartományban lévő mért érték (lásd a táblázatokat) középértékét adják meg olvadáspontként.

▼B

Amennyiben az olvadás kezdetén és végső szakaszában mért hőmérséklet közötti különbség a módszer pontossági határai között van, az olvadás végső szakaszában mért hőmérsékletet kell olvadáspontnak tekinteni; egyébként meg kell adni mind a két hőmérsékletet.

Amennyiben az anyag elbomlik vagy szublimál az olvadáspont elérése előtt, meg kell adni azt a hőmérsékletet, amelynél ez a hatás megfigyelhető.

A vizsgálati jelentésben közölni kell minden, az eredmények értelmezése szempontjából lényeges információt és megjegyzést, különösen azokat, amelyek az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosak.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 102. vizsgálati irányelv, a Tanács határozata, C(81) 30 végleges.

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

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

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

▼B

Függelék

További technikai információt például a következő szabványok nyújthatnak.

1. **Kapilláris módszerek**

1.1. Olvadáspontmérő készülékek folyadékfürdővel

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

1.2. Olvadáspontmérő készülékek fémblokkal

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

2. **Fűtőasztal**

2.1. Kofler-féle fűtőasztal

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

2.2. Olvadáspont-vizsgáló mikroszkóp

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Meniszkusz-módszer (poliamidok)

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. **Módszerek a fagyáspont meghatározására**

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

4. **Termikus analízis**

4.1. Differenciál termoanalízis

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. Differenciál scanning 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. **Dermedéspont meghatározása**

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. FORRÁSPONT

1. MÓDSZER

A leírt módszerek többsége az OECD vizsgálati irányelveken (1) alapul. Az alapelveket a (2) és (3) szakirodalom ismerteti.

1.1. BEVEZETÉS

Az itt leírt módszerek és eszközök folyadékokhoz és alacsony olvadáspontú anyagokhoz alkalmazhatók, feltéve hogy azok a forráspont alatt nem mennek keresztül kémiai reakción (például autooxidáció, átrendeződés, bomlás stb.). A módszerek tiszta és szennyezett folyékony anyagokhoz alkalmazhatók.

A hangsúly a fotocellás meghatározást és a termikus analízist használó módszereken van, mivel ezek a módszerek lehetővé teszik az olvadás-, valamint a forráspontok meghatározását. Ezenkívül a mérések automatikusan hajthatók végre.

A „dinamikus módszernek” megvan az az előnye, hogy a gőznyomás meghatározásához is alkalmazható, és nincs szükség a forráspontnak a normál nyomásra (105,325 kPa) történő átszámítására, mivel a normál nyomás a mérés során manosztát segítségével beállítható.

Megjegyzések:

A szennyeződéseknek a forráspont meghatározására gyakorolt hatása nagymértékben függ a szennyezés természetétől. Amennyiben olyan illékony szennyezések vannak a mintában, amelyek befolyásolhatják az eredményt, az anyag még tisztítható lehet.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A normál forráspont az a hőmérséklet, amelynél valamely folyadék gőznyomása 101,325 kPa.

Amennyiben a forráspontot nem normál légköri nyomáson mérik, a gőznyomásnak a hőmérséklettől való függése a Clausius–Clapeyron egyenlet segítségével írható le:

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

ahol:

p = az anyag gőznyomása Pascalban

H_v = az anyag párolgási hője mol^{-1} mértékegységben

R = általános moláris gázállandó = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = termodinamikus hőmérséklet K-ben

A forráspontot a mérés során észlelhető környezeti nyomás figyelembevételével adják meg.

▼B

Átszámítások

Nyomás (mértékegysége: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(a „bar” még mindig megengedhető, de nem ajánlott)

133 Pa = 1 Hgmm = 1 Torr

(a „Hgmm” és „Torr” mértékegységek nem megengedettek)

1 atm = normál atmoszféra = 101 325 Pa

(az „atm” mértékegység nem megengedett)

Hőmérséklet (mértékegység: K)

$t = T - 273,15$

t: Celsius hőmérséklet, Celsius-fok (^{o}C)

T: termodinamikus hőmérséklet, Kelvin (K)

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel kapott eredményekkel.

Néhány kalibrációs anyag a függelékben felsorolt módszerek leírásában található.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A forráspont (forrásponttartomány) meghatározására szolgáló öt módszer a forráspont mérésén, míg két további módszer termikus analízisen alapul.

1.4.1. **Meghatározás ebulliométer segítségével**

Az ebulliométereket eredetileg a forráspont-növekedés alapján történő molekulasúlymeghatározáshoz fejlesztették ki, de pontos forráspont-mérésekhez is alkalmasak. Az ASTM D 1120-72-es szabvány egy nagyon egyszerű készüléket ismertet (lásd a függeléket). A folyadékot ebben a készülékben egyensúlyi körülmények között, légköri nyomáson forrásig hevítik.

1.4.2. **Dinamikus módszer**

E módszerrel a gőz újrakondenzálódási hőmérsékletét mérik forráskor, megfelelő hőmérővel a refluxban. A módszerben a nyomás változtatható.

1.4.3. **Desztillációs módszer forráspont meghatározására**

Ez a módszer a folyadék desztillálását, a gőz kondenzációs hőmérsékletének mérését és a desztillátum mennyiségének meghatározását foglalja magában.

▼B

1.4.4. **Siwoloboff-módszer**

A mintát folyadékfürdőbe merített mintacsőben melegítik. A mintacsőbe bemerítenek egy, az alsó részében levegőbuborékot tartalmazó, az alján összeolvasztott hajszálcsövet.

1.4.5. **Fotocellás meghatározás**

A Siwoloboff-alapelvet követve automatikus fotoelektromos mérést hajtanak végre felszálló buborékok segítségével.

1.4.6. **Differenciál-termoanalízis**

Ez a módszer az anyag és egy referenciaanyag közötti hőmérséklet-különbséget a hőmérséklet függvényében regisztrálja, miközben az anyagot és a referenciaanyagot ugyanazzal az irányított hőmérséklet-programmal vizsgálják. Amikor a minta entalpiaváltozással járó fázisátalakuláson megy át, ezt a változást a regisztrált hőmérsékleti görbe alapvonalától való endoterm eltérés (forrás) jelzi.

1.4.7. **Differenciál scanning kalorimetria**

Ez a módszer az anyagba és a referenciaanyagba történő energiabevitelek közötti különbséget regisztrálja a hőmérséklet függvényében, miközben az anyagot és a referenciaanyagot ugyanazzal az irányított hőmérsékletprogrammal vizsgálják. Ez az energia az anyag és a referenciaanyag közötti nulla hőmérséklet-különbség létrehozásához szükséges energia. Amikor a minta entalpiaváltozással járó fázisátalakuláson megy át, ezt a változást a hőáramlási görbe alapvonalától való endoterm eltérés (forrás) jelzi.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Az 1. táblázat sorolja fel a forráspont/forrástartomány meghatározásához használt különböző módszerek alkalmazhatóságát és pontosságát.

1. táblázat

A módszerek összehasonlítása

Mérési módszer	Becsült pontosság	Meglévő szabvány
Ebulliométer	± 1,4 K (373 K-ig) (1) (2) ± 2,5 K (600 K-ig) (1) (2)	ASTMD 1120-72 (1)
Dinamikus módszer	± 0,5 K (600 K-ig) (2)	
Desztillációs folyamat (forrási tartomány)	± 0,5 K (600 K-ig)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Siwoloboff szerint	± 2 K (600 K-ig) (2)	
Fotocellás meghatározás	± 0,3 K (373 K-ig) (2)	
Differenciál-termokalorimetria	± 0,5 K (600 K-ig) ± 2,0 K (1 273 K-ig)	ASTM E 537-76
Differenciál scanning kalorimetria	± 0,5 K (600 K-ig) ± 2,0 K (1 273 K-ig)	ASTM E 537-76

(1) Ez a pontosság csak az olyan egyszerű készülékhez érvényes, mint amelyet például az ASTM D1120-70 ír le; a pontosság növelhető korszerű ebulliométerrel.

(2) Csak tiszta anyagokra érvényes. Más körülmények közötti használatát indokolni kell.

▼B

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

A nemzetközi és nemzeti szabványok (lásd a függeléket) csaknem minden vizsgálati módszert tartalmaznak.

1.6.1. **Ebulliométer**

Lásd a függeléket.

1.6.2. **Dinamikus módszer**

Lásd a gőznyomás meghatározására szolgáló A.4-es vizsgálati módszert.

Az észlelt forráspontot 101,325 kPa alkalmazott nyomás mellett adják meg.

1.6.3. **Desztillációs folyamat (forrási tartomány)**

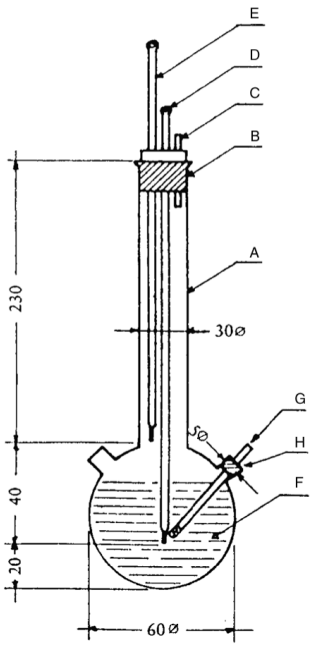
Lásd a függeléket.

1.6.4. **Siwoloboff-módszer**

A mintát egy olvadáspontmérő készülékben, egy körülbelül 5 mm átmérőjű mintacsőben melegítik (1. ábra).

Az 1. ábra a szabványosított olvadás- és forráspontmérő készülékek egyik típusát (JIS K 0064) mutatja be (üvegből készült, minden méret milliméterben van megadva).

1. ábra



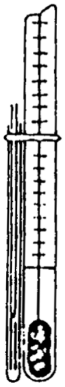
A: Mérőedény
B: Dugó
C: Szellőzőnyílás
D: Hőmérő
E: Segédhőmérő
F: Folyadékfürdő
G: Mintacső, maximum 5 mm-es kűlső átmérőjű; egy körülbelül 100 mm hosszú, körülbelül 1 mm belső átmérőjű és körülbelül 0,2–0,3 mm falvastagságú kapilláris csövet tartalmaz
H: Oldalcső

A mintacsőbe egy, az alsó vége fölött körülbelül 1 cm-rel leforrasztott kapilláris csövet helyeznek be (forrási kapilláris). A vizsgált anyagot addig töltik be, hogy a kapilláris leforrasztott szakasza a folyadék felszíne alatt legyen. A forrási kapillárist tartalmazó mintacsövet a hőmérőhöz rögzítik egy gumiszalaggal, vagy oldalról egy tartóval rögzítik (lásd a 2. ábrát):

▼B

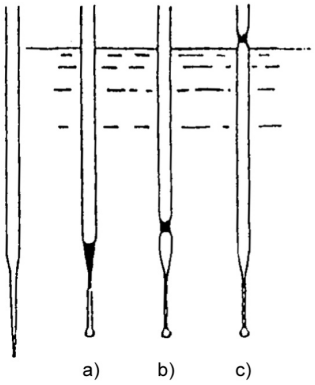
2. ábra

Müködési alapelv Siwoloboff szerint



3. ábra

Módosított alapelv



A folyadékfürdőt a forráspontnak megfelelően választják ki. 573 K hőmérsékletig szilikonolaj használható. Paraffinolaj csak legfeljebb 473 K-ig használható. A fürdőben lévő folyadék melegítését először 3 K/perc hőmérséklet-növekedésre kell beállítani. A folyadékfürdőt keverni kell. A várt forráspont alatt körülbelül 10 K-nel csökkenteni kell a melegítést úgy, hogy a hőmérséklet-növekedés üteme 1 K/perc értéknél kisebb legyen. A forráspont megközelítésekor gyors ütemben buborékok kezdenek megjelenni a forraló kapillárisból.

A forráspont az a hőmérséklet, amelynél, további hűtéskor, megáll a buboréklánc, és hirtelen növekedni kezd a folyadékszint a kapillárisban. Az ennek megfelelő, a hőmérőn látható érték az anyag forráspontja.

A módosított alapelv esetében (3. ábra) a forráspontot egy olvadáspont mérésére szolgáló kapillárisban határozzák meg. Ezt a kapillárist megnyújtották hegyes csúcsúra körülbelül 2 cm hosszúságban (a), és ezzel kis mennyiségű mintát szívnak fel. A hegyes kapilláris cső nyitott végét összeolvasztással lezárják úgy, hogy a végén legyen egy kis légbuborék. Az olvadáspont meghatározására szolgáló készülék melegítésekor (b) kitágul a légbuborék. A forráspont annak a hőmérsékletnek felel meg, amelynél az anyagból álló dugó eléri a folyadékfürdő felületének szintjét (c).

1.6.5. **Fotocellás meghatározás**

A mintát egy fűtött fémblokkba helyezett kapilláris csőben melegítik.

A blokkban lévő alkalmas nyílásokon keresztül egy fénysugarat irányítanak az anyagon át egy pontosan kalibrált fotocellára.

A minta hőmérséklet-növekedése során egyenként légbuborékok jelennek meg a forrásban lévő anyagot tartalmazó kapillárisból. A forráspont elérésekor nagymértékben megnövekszik a buborékok száma. Ez változást hoz létre a fényerőben, amelyet egy fotocella regisztrál, és stopjelet ad a blokkban elhelyezett platina ellenállás-hőmérő hőmérsékletét jelző készüléknek.

A módszer különösen hasznos, mivel lehetővé teszi a szobahőmérséklet alatti meghatározásokat egészen 253,15 K-ig (–20 °C) anélkül, hogy bármilyen változtatást kellene végrehajtani a készülékben. A készüléket egyszerűen el kell helyezni egy hűtőfürdőben.

▼B

1.6.6. **Termikus analízis**

1.6.6.1. *Differenciál-termoanalízis*

Lásd a függeléket.

1.6.6.2. *Differenciál scanning kalorimetria*

Lásd a függeléket.

2. **ADATOK**

A normál nyomástól való kis eltéréseknél (max. ± 5 kPa) a forráspontokat T_n-re normalizálják az alábbi, Sidney Young-féle számértékegyenlet segítségével:

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

ahol:

$\Delta p = (101{,}325 - p)$ [figyeljen az előjelre]

P = mért nyomás kPa mértékegységben

f_T = forráspontváltozás üteme a nyomás függvényében, K/kPa mértékegységben

T = mért forráspont K-ben

T_n = normál nyomásra korrigált forráspont K-ben

Számos anyagra a hőmérséklet-korrekciós tényezőket, az f_T-t, és a közelítő meghatározásokra szolgáló egyenleteket a fent említett nemzetközi és nemzeti szabványok tartalmazzák.

Például a DIN 53171-es módszer a festékekben lévő oldószerekhez a következő közelítő korrekciókat említi meg:

2. táblázat

Hőmerseklet-korrekcios tényezők, F_T

Hőmérséklet, T (K)	Korrekciós tényező, 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. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az alkalmazott módszert,

— az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyezések), és amennyiben van ilyen, az előzetes tisztítási fok pontos ismertetését,

— a pontosság becslését.

Legalább két, a becsült pontossági tartományban lévő mért érték (lásd az 1. táblázatot) középértékét adják meg olvadáspontként.

Meg kell adni a mért forráspontokat és azok középértékét, továbbá kPa-ban azt (azokat) a nyomást (nyomásokat), amelyeknél a méréseket végrehajtották. A nyomásnak lehetőleg a normál légköri nyomáshoz kell közel lennie.

Meg kell adni az eredmények értelmezéséhez lényeges valamennyi információt és megjegyzést, különösen azokat, amelyek az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosak.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, a 103. vizsgálati irányelv, a Tanács határozata, C(81) 30 végleges.

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

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

▼B

Függelék

További technikai információt például a következő szabványok nyújthatnak:

1. **Ebulliométer**

1.1. Olvadáspontmérő készülékek folyadékfürdővel

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

2. **Desztillációs folyamat (forrási tartomány)**

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

3. **Differenciál-termoanalízis és differenciál scanning 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. RELATÍV SŰRŰSÉG

1. MÓDSZER

A leírt módszerek az OECD vizsgálati irányelveken (1) alapulnak. Az alapelveket a (2) szakirodalom ismerteti.

1.1. BEVEZETÉS

Az itt leírt, a relatív sűrűség meghatározására szolgáló módszerek szilárd és folyékony anyagokhoz alkalmazhatók, a tisztasági fokukra vonatkozó korlátozás nélkül. Az 1. táblázat sorolja fel a különböző alkalmazandó módszereket.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A szilárd anyagok vagy folyadékok D^{20}_{4} relatív sűrűsége a vizsgált anyag 20 °C hőmérsékleten meghatározott térfogatának tömege és a 4 °C hőmérsékleten meghatározott ugyanolyan térfogatú víz tömege közötti arány.

A relatív sűrűség dimenzió nélküli szám.

Valamely anyag ρ sűrűsége az m tömegének és v térfogatának a hányadosa. A ρ sűrűség Sí-mértékegységben kg/m^3 -ben van megadva.

1.3. REFERENCIAANYAGOK (1) (3)

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel nyert eredményekkel.

1.4. A MÓDSZEREK ALAPELVE

Négy különböző osztályba sorolt módszer használatos.

1.4.1. **Felhajtóerőn alapuló módszer**

1.4.1.1. *Hidrométer (folyékony anyagokhoz)*

Megfelelően pontos és gyors sűrűségmeghatározások érhetők el úszó hidrométerekkel, amelyek lehetővé teszik valamely folyadék sűrűségének meghatározását a merülési mélysége alapján, egy skála leolvasásával.

1.4.1.2. *Hidrosztatikus mérleg (folyékony és szilárd anyagokhoz)*

A levegőben és egy alkalmas folyadékban (például vízben) mért vizsgálati minta tömege közötti különbség használható a minta sűrűségének meghatározására.

Szilárd anyagok esetében a mért sűrűség csak az adott, méréshez használt minta sűrűségét reprezentálja. Folyadékok sűrűségének meghatározásához megmérik egy ismert v térfogatú test tömegét levegőben, majd a folyadékban.

1.4.1.3. *Merülőtest-módszer (folyékony anyagokhoz) (4)*

E módszerben valamely folyadék sűrűségét a vizsgált folyadékba ismert térfogatú test bemerítése előtt és után a folyadék tömegéből határozzák meg.

▼B

1.4.2. **Piknométeres módszerek**

Szilárd anyagokhoz vagy folyadékokhoz különböző alakú és ismert térfogatú piknométerek használhatók. A sűrűséget a megtöltött és üres piknométer tömege közötti különbségből és annak ismert térfogatából számítják ki.

1.4.3. **Levegő-összehasonlítású piknométer (szilárd anyagokhoz)**

A szilárd test sűrűsége, alakjától függetlenül, szobahőmérsékleten, gáz-összehasonlítású piknométerrel mérhető meg. Ehhez az anyag térfogatát levegőben vagy inert gázban egy állítható, kalibrált térfogatú hengerben mérik meg. A sűrűség számításához a térfogatmérés befejezését követően tömegmérést végeznek.

1.4.4. **Oszcillációs sűrűségmérő (5) (6) (7)**

Valamely folyadék sűrűsége megmérhető oszcillációs sűrűségmérővel. Egy U-cső alakban gyártott mechanikus oszcillátort rezegtetnek az oszcillátor tömegétől függő oszcillátor rezonanciafrekvenciáján, amely ennek tömegétől függ. A minta bevitele megváltoztatja az oszcillátor rezonanciafrekvenciáját. A készüléket két, ismert sűrűségű folyékony anyag segítségével kell kalibrálni. Ezeket az anyagokat lehetőleg úgy kell kiválasztani, hogy a sűrűségük lefedje a mérni kívánt tartományt.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A relatív sűrűség meghatározására használt különböző módszerek alkalmazhatóságát a táblázat sorolja fel.

1.6. A MÓDSZEREK LEÍRÁSA

A függelék ismerteti azokat a példaként megadott szabványokat, amelyeket a további technikai részletek megismeréséhez tanulmányozni kell.

A vizsgálatokat 20 °C hőmérsékleten kell végrehajtani, és legalább két mérést kell elvégezni.

2. **ADATOK**

Lásd a szabványokat.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— az alkalmazott módszert,

— az anyag pontos leírását (azonosság és szennyeződések) és előzetes tisztítási foka, amennyiben van ilyen.

A D_4^{20} relatív sűrűséget az 1.2. pontban meghatározott módon kell megadni a mért anyag fizikai állapotával együtt.

Meg kell adni az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden információt és megjegyzést, különösen azokat, amelyek az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosak.

▼B

Táblázat

A módszerek alkalmazhatósága

Mérési módszer	Sűrűséget		A leginkább lehetséges dinamikus viszkozitás	Meglévő szabványok
	Szilárd anyag	Folyadék		
1.4.1.1. Hidrométer		igen	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2 Hidrosztatikus mérleg				
a) szilárd anyagok	igen			ISO 1183 (A)
b) folyadékok		igen	5 Pa s	ISO 901 és 758
1.4.1.3. Merűlőtest-módszer		igen	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Piknométer				ISO 3507
a) szilárd anyagok	igen			ISO 1183(B) NF T 20-053
b) folyadékok		igen	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. levegő összehasonlítós piknométer	igen			DIN 55990 Teil 3. DIN 53243
1.4.4. Oszcillációs sűrűségmérő		igen	5 Pa s	

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 109. vizsgálati irányelv, a Tanács C(81) 30. határozata, végleges.

(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

Függelék

További technikai információt például a következő szabványok nyújtanak:

1. **Felhajtóerőn alapuló módszer**

1.1. Hidrométer

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

1.2. Hidrosztatikus mérleg

Szilárd anyagokhoz

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

Folyékony anyagokhoz

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 és 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. Merülőtest-módszer

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

2. **Piknométeres módszerek**

2.1. Folyékony anyagokhoz

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 x $l0^{-6}$ 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 x 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 – Pycnometric method

▼B

2.2.	Szilárd anyagokhoz	
	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 – Pycnometric method
	DIN 19683	Determination of the density of soils
3.	**Levegő-összehasonlítású piknométer**	
	DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichrungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
	DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4. GŐZNYOMÁS

1. MÓDSZER

Ez a módszer megfelel az OECD TG 104 (2004) jelű módszernek.

1.1. BEVEZETÉS

Az A.4. (1) módszer jelen átdolgozott változata tartalmaz egy újabb módszert: „Effúziós módszer: izoterm termogravimetria”, amit nagyon kis gőznyomású (10^{-10} Pa-ig) anyagokra dolgoztak ki. Az eljárásokra vonatkozó igények, különösen a kis gőznyomású anyagok gőznyomásának mérése iránti igények alapján a módszer más eljárásai is átértékelésre kerültek további alkalmazási tartományokat illetően.

Termodinamikailag egyensúlyban lévő tiszta anyagok gőznyomása csak a hőmérséklet függvénye. Az alapelvek ismertetése megtalálható az irodalomban (2)(3).

Nincs egyetlen mérési eljárás a gőznyomás mérésére a 10^{-10} Pa alattitól a 10^{5} Pa-ig terjedő tartomány egészére. Ez a módszer nyolc különböző gőznyomásmérési módszert foglal magában, melyek különböző gőznyomás-tartományokra alkalmazhatóak. Az 1. táblázat a különböző módszereket hasonlítja össze az alkalmazásuk és a mérési tartományok szerint. A módszereket csak olyan anyagok esetén lehet alkalmazni, amelyek nem bomlanak a mérés körülményei között. Azokban az esetekben, amikor kísérleti módszerek eljárástechnikai okok miatt nem alkalmazhatók, a gőznyomás becsléssel is megállapítható, és a függelék tartalmaz egy ajánlott becslési módszert.

1.2. DEFINÍCIÓK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Egy anyag gőznyomása definíció szerint a szilárd vagy folyékony anyag felett kialakult, telített gőz nyomása.

A nyomás SI mértékegységét, a pascalt (Pa) kell használni. Korábban alkalmazott más mértékegységek, és átváltási tényezőik:

1 torr = 1 Hgmm = $1{,}333 \times 10^{2}$ Pa

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

1 bar = 10^{5} Pa

Az SI szerinti hőmérséklet-mértékegység a kelvin (K). A Celsius fok átváltása kelvin fokra a következő egyenlet alapján történik:

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

ahol T a kelvinben mért, más néven termodinamikai hőmérséklet, t pedig a hőmérséklet Celsius fokban.

▼M1

1. táblázat

Mérési módszer	Anyag		becsült ismételhetőség	becsült reprodukálhatóság	ajánlott tartomány
	szilárd	folyékony			
Dinamikus módszer	kis olvadáspont	Igen	25 %-ig 1–5 %	25 %-ig 1–5 %	10^3 Pa–2 × 10^3 Pa 2 × 10^3 Pa–10^5 Pa
Statikus eljárás	Igen	Igen	5–10 %	5–10 %	10 Pa–10^5 Pa 10^{-2} Pa–10^5 Pa ([1])
Izoteniszkópos módszer	Igen	Igen	5–10 %	5–10 %	10^2 Pa–10^5 Pa
Effúziós módszer: gőznyomás-egyensúly	Igen	Igen	5–20 %	50 %-ig	10^{-3}–1 Pa
Effúziós módszer: Knudsen-cella	Igen	Igen	10–30 %	—	10^{-10}–1 P
Effúziós módszer: izoterm termogravimetria	Igen	Igen	5–30 %	50 %-ig	10^{-10}–1 Pa
Gáztelítéses eljárás	Igen	Igen	10–30 %	50 %-ig	10^{-10}–10^3 Pa
Rotoros eljárás	Igen	Igen	10–20 %	—	10^{-4}–0,5 Pa

([1]) Kapacitív manometer használatakor.

1.3. A MÉRÉS ELVE

A gőznyomás meghatározása általában különböző hőmérsékleteken történik. Véges hőmérséklettartományban a tiszta anyag gőznyomásának logaritmusa lineáris függvénye a termodinamikai hőmérséklet reciprokának, az egyszerűsített Clapeyron-Clausius egyenlet szerint:

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

ahol:

p = gőznyomás, pascal (Pa)

ΔHv = párolgási entalpia, J $mól^{-1}$

R = egyetemes gázállandó, 8,314 J $mól^{-1}$ K^{-1}

T = hőmérséklet, kelvin fok (K)

▼M1

1.4. REFERENCIAANYAGOK

Referenciaanyagokat nem szükséges használni. Ezek elsődlegesen a módszer alkalmasságának rendszeres ellenőrzésére szolgálnak, illetve lehetővé teszik a különböző módszerekkel kapott eredmények összehasonlítását.

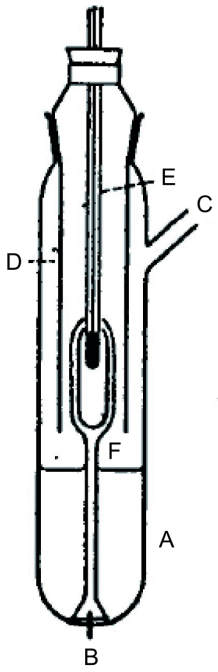
1.5. AZ ELJÁRÁS LEÍRÁSA

1.5.1. **Dinamikus eljárás (Cottrell-módszer)**

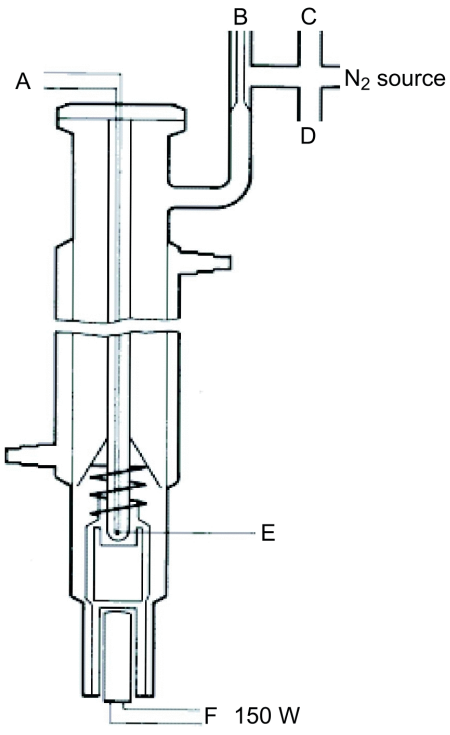
1.5.1.1. *Elv*

Az anyag gőznyomását a forráspontnak különböző meghatározott nyomásokon (kb. 10^3 és 10^5 Pa közötti tartományban) történő mérésével határozzuk meg. Ez az eljárás ajánlott a forráspont meghatározására is. Erre a célra egészen 600 K-ig használható. A folyadékok forráspontja 3–4 cm-rel a folyadék felszíne alatt közelítőleg 0,1 °C-kal nagyobb, mint a felszínén, a folyadékoszlop hidrosztatikai nyomása miatt. A Cottrell-módszernél (4) a hőmérő a folyadék felszíne fölötti gőztérben van, és a forrásban lévő folyadék a forrás szivattyúzó hatásának köszönhetően folyamatosan elborítja a hőmérő érzékelőjét. Ekkor egy vékony folyadékréteg fedi be a hőmérő érzékelőgömbjét, amely egyensúlyt tart a gőzzel a környezeti nyomáson. A hőmérő így a valódi forráspontot mutatja, a túlhevítés, vagy a hidrosztatikai nyomásból eredő hiba nélkül. Az eredeti Cottrell-szivattyú az 1. ábrán látható. Az A jelű lombik tartalmazza a forrásban lévő folyadékot. Egy platinaszál (B) van a lombik fenekébe forrasztva, biztosítva az egyenletes forrást. A C jelű csonk egy kondenzátorral van összekötve, a D jelű köpeny pedig megakadályozza, hogy a hideg kondenzátum elérje a hőmérőt (E). Amikor a folyadék forr a lombikban, a tölcsér által felfogott buborékok és folyadék a szivattyú két ágán (F) keresztül ráfolyik a hőmérő gömbjére.

1. ábra



2 ábra



▼**M1**

Cottrell-szivattyú (4)

A: Hőelem

B: Vákuumpuffer

C: Nyomásmérő

D: Vákuum

E: Mérőpont

F: Fűtőelem, körülbelül 150 W-os

1.5.1.2. *Készülék*

A Cottrell-elv alapján működő, nagyon pontos készülék látható a 2. ábrán. Ez egy lombikból áll, amelynek az alsó részén történik a forralás, a középső részén van egy hűtő, és a felső részén van egy kivezetés és egy zárófedél. A Cottrell-szivattyú a forrástérben van elhelyezve, amit egy elektromos fűtőbetét hevít. A hőmérsékletet a zárófedélen keresztül bevezetett tokozott hőelem, vagy pedig ellenállás-hőmérő méri. A kivezetés a nyomásszabályozó rendszerbe van bekötve. Az utóbbi egy vákuumszivattyúból, egy puffertérből, egy nitrogénadagolással működő nyomásszabályozóból, és egy nyomásmérőből áll.

1.5.1.3. *Eljárás*

Az anyagot a forrástérbe helyezzük. Nem porszerű szilárd anyagok problémát jelenthetnek, de ezek néha kiküszöbölhetőek a hűtőköpeny fűtésével. A készüléket a fedéllel lezárjuk, és az anyagot gáztalanítjuk. Habzó anyag nem mérhető ezzel a módszerrel.

Ezután beállítjuk a legkisebb kívánt nyomást és bekapcsoljuk a fűtést. Ugyanekkor a hőmérsékletérzékelőt rákötjük egy regisztrálóműszerre.

Az egyensúlyt akkor értük el, amikor állandó nyomás mellett a regisztrálóműszer állandó forrási hőmérsékletet mutat. Külön figyelmet kell fordítani arra, hogy elkerüljük a megfutást a forralás alatt. Fontos továbbá, hogy teljes kondenzáció történjen a hűtőben. Amikor kis olvadáspontú szilárd anyag gőznyomását határozzuk meg, figyelmet kell fordítani a hűtő esetleges eltömődésének elkerülésére is.

Az egyensúlyi pont regisztrálása után állítsuk be a következő kívánt nyomást. A folyamatot egészen a 10^5 Pa eléréséig folytatjuk (összesen kb. 5–10 mérési pont). Ellenőrzésként ismételjük meg az eljárást visszafelé, úgy, hogy a nyomásértékek csökkennek.

1.5.2. **Statikus eljárás**

1.5.2.1. *Elv*

A statikus eljárásban (5), a gőznyomást egy adott hőmérsékleten termodinamikai egyensúlyban határozzuk meg. Ez az eljárás olyan anyagokhoz, többkomponensű folyadékokhoz és szilárd anyagokhoz használható, melyek gőznyomástartománya 10^{-1}–10^5 Pa tartományban van, valamint, megfelelő gondossággal, használható az 1–10 Pa tartományban is.

▼**M1**

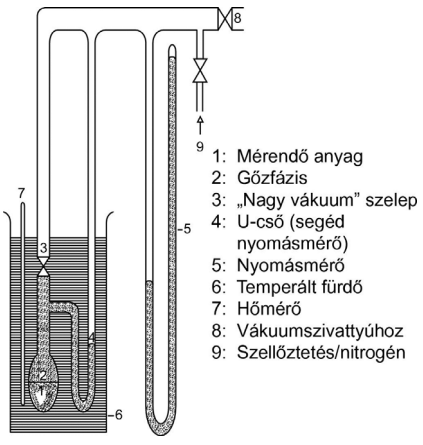
1.5.2.2. *Készülék*

A készülék egy állandó hőmérsékletű (pontosság: ± 0,2 K) fürdőből, egy vákuumvezetékhez kapcsolt mintatartályból, egy nyomásmérőből, és egy nyomásszabályozó rendszerből áll. A mintatartály (3a. ábra) egy szelepen és egy nyomáskülönbség-mérőn (U-csöves manométer alkalmas folyadékkal) keresztül kapcsolódik a vákuumvezetékhez, ez utóbbi a nulla nyomáskülönbség jelzésére szolgál. A nyomástartománytól és a mérendő anyag kémiai viselkedésétől függően higany, szilikonok és ftalátok használhatók az U-csöves manométerben. Környezetvédelmi szempontok miatt azonban a higany használata lehetőség szerint kerülendő. A mérendő anyag nem oldódhat észlelhető mértékben az U-csöves manométerben lévő folyadékban, és nem léphet vele reakcióba. Az U-csöves manométer helyett használható nyomásmérő (3b. ábra). Az U-csöves manométerben higany a légköri nyomástól a 10^2 Pa-ig terjedő tartományban használható, míg a szilikonfolyadékok és ftalátok 10^2 Pa alatt is használhatók, egészen 10 Pa nyomásig. Léteznek más nyomásmérők is, amelyeket lehet 10^2 Pa alatt használni, és a fűthető membrános kapacitív nyomásmérők használhatók még 10^{-1} Pa alatt is. A hőmérséklet mérése a mintát tartalmazó edény külső falán vagy magában az edényben történik.

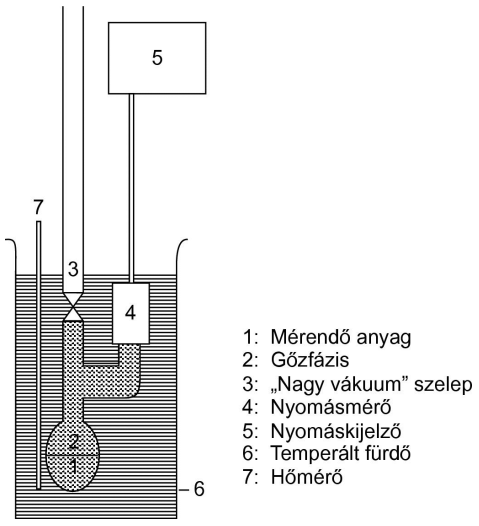
1.5.2.3. *Eljárás*

A 3a. ábrán látható készülék használata esetén a mérés megkezdése előtt az U-csöves manométert megtöltjük a kiválasztott folyadékkal, amelyet a mérések megkezdése előtt melegítéssel gáztalanítani kell. Helyezzük be a mérendő anyagot a készülékbe és gáztalanítsuk csökkentett hőmérsékleten. Többkomponensű minta esetében olyan kis hőmérsékletet kell alkalmazni, amelyen a mérendő anyag összetétele még nem változik meg. Az egyensúly beállását keveréssel gyorsíthatjuk. A minta folyékony nitrogénnel vagy szárazjéggel hűthető, de vigyázni kell, hogy elkerüljük a levegőben lévő pára, vagy a szivattyúfolyadék lecsapódását A mintatartó edény fölött lévő szelepet kinyitva néhány perces szivattyúzással eltávolítjuk a levegőt. Ha szükséges, a gáztalanítási műveltet néhányszor megismételjük.

3a. ábra



3b. ábra



▼M1

Amikor a szelep zárva van és hevítjük az anyagot, a gőznyomás nő. Ez megváltoztatja a folyadék egyensúlyát az U-csőben. Ellensúlyozandó ezt a hatást, nitrogént vagy levegőt engedünk a rendszerbe addig, amíg a nyomáskülönbség-mérő ismét nullát nem mutat. A kiegyenlítéshez szükséges nyomás értéke leolvasható a manométerről, vagy egy nagyobb pontosságú műszerről. Ez a nyomás felel meg az anyag gőznyomásának az adott hőmérsékleten. Ha a 3b. ábrán látható készüléket használjuk, akkor a gőznyomás közvetlenül leolvasható.

A gőznyomás meghatározása megfelelő kis hőmérsékletintervallumonként történik (összesen kb. 5–10 mérési pont) egészen a kívánt legnagyobb hőmérsékletig.

A kis hőmérsékletértékeket eredményező méréseket ellenőrzés céljából meg kell ismételni. Ha a megismételt mérés eredménye nem esik egybe a növekvő hőmérsékletre kapott görbével, az a következő két eset valamelyikére vezethető vissza:

i. a minta még mindig tartalmaz levegőt (pl. nagy viszkozitású anyagok esetében) vagy kis forráspontú anyagokat, melyek felszabadulnak a melegítés alatt;

ii. az anyagnál kémiai reakció lép fel a vizsgált hőmérséklettartományban (pl. bomlás, polimerizáció).

1.5.3. **Izoteniszkópos eljárás**

1.5.3.1. *Elv*

Az izoteniszkóp (6) a statikus eljárás elvén alapul. A módszernél az anyagot egy állandó hőmérsékleten tartott gömbbe helyezzük, és csatlakoztatunk egy manométert és egy vákuumszivattyút. Az anyagnál illékonyabb szennyeződések csökkentett nyomás mellett gáztalanítással eltávolíthatók. A minta gőznyomását adott hőmérsékleteken ismert nyomású semleges gázzal egyensúlyba hozzuk. Az izoteniszkópot egyes folyékony szénhidrogének mérésére fejlesztették ki, de alkalmas szilárd anyagok vizsgálatára is. A módszer általában nem alkalmazható többkomponensű rendszerek esetében. Nem illékony szennyeződéseket tartalmazó minták esetében az eredményekben csak kisebb hibák jelentkeznek. Az ajánlott tartomány 10^2–10^5 Pa.

1.5.3.2. *Készülék*

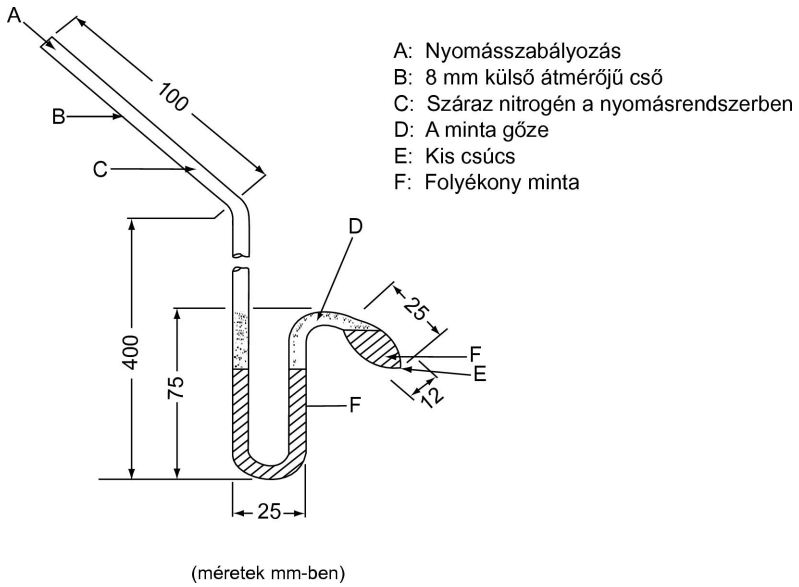
A mérőkészülékre a 4. ábrán látható példa. Teljes leírás az ASTM D 2879–86 szabványban (6) található.

▼**M1**

1.5.3.3. *Eljárás*

Folyadékok esetén magát az anyagot használjuk töltőfolyadékként az U-csöves manométerben. Az izoteniszkópba elegendő folyadékot töltünk ahhoz, hogy a gömb és a manométer rövidebb szára feltöltődjön. Az izoteniszkópot csatlakoztatjuk egy vákuumrendszerhez, kiszivattyúzzuk a levegőt majd megtöltjük nitrogénnel. A kiszivattyúzást és a rendszer átöblítését kétszer megismételjük, hogy eltávolítsuk a maradék oxigént. A megtöltött izoteniszkópot vízszintes helyzetbe állítjuk, hogy a minta vékony rétegben szétterüljön a mintatartó gömbben és a manométerben. A rendszer nyomását 133 Pa-ra csökkentjük, és a mintát óvatosan melegítjük, amíg éppen forrni nem kezd (az oldott gázok eltávolítása). Ezután az izoteniszkópot úgy helyezzük el, hogy a minta visszatérjen a gömbbe és feltöltse a manométer rövid szárát. A nyomást 133 Pa-on kell tartani. A mintatartó gömb elnyújtott csúcsát kis lánggal hevítjük úgy, hogy a mintából felszabaduló gőz elegendően kiterjedjen ahhoz, hogy kiszorítsa a minta egy részét a mintatartó gömb felső részéből és a manométer szárából a manométerbe, előállítva így egy gőzzel töltött, nitrogénmentes teret. Ezután az izoteniszkópot állandó hőmérsékletű fürdőbe merítjük, és a nitrogén nyomását beállítjuk úgy, hogy egyenlő legyen a mintáéval. Egyensúlyban a nitrogén nyomása megegyezik az anyag gőznyomásával.

4. ábra



(méretek mm-ben)

Szilárd anyag esetén a hőmérséklet- és nyomástartománytól függően a manométer töltőfolyadékaként szilikonfolyadékok, vagy ftalátok használhatók. A gáztalanított manométerfolyadékot az izoteniszkóp hosszú szárán kialakított öblösebb részbe töltjük be. Ezután a vizsgálandó szilárd anyagot behelyezzük a mintatartó gömbbe, és melegítéssel gáztalanítjuk. Ezt követően az izoteniszkópot megdöntjük, hogy a manométerfolyadék befolyjon az U-csőbe.

▼M1

1.5.4. **Effúziós eljárás: gőznyomás-egyensúly** (7)

1.5.4.1. *Elv*

A vizsgálati anyagból vett mintát légüres búra alatt egy kis kemencében hevítjük. A kemence fedelén ismert átmérőjű kis lyukak vannak. Az anyag gőze kilép az egyik lyukon és egy nagyon érzékeny mérleg serpenyőjébe jut, ami szintén a légüres búra alatt van. Néhány konstrukcióban a mérleg serpenyője egy hűtődobozban van, ami hővezetéssel kivonja a hőt a kültérbe, és a serpenyőt hősugárzás révén hűti, hogy a gőz kondenzálódjon rajta. A kilépő gőz nyomatéka erőként hat a mérlegre. A gőznyomást kétféleképpen kaphatjuk meg: közvetlenül a mérleg serpenyőjére ható erőből, vagy pedig a párolgási sebességből, a Hertz-Knudsen egyenlet segítségével (2):

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

ahol:

G = párolgási sebesség (kg s^{-1} m^{-2})

M = moláris tömeg (g mol^{-1})

T = hőmérséklet (K)

R = egyetemes gázállandó (J mol^{-1} K^{-1})

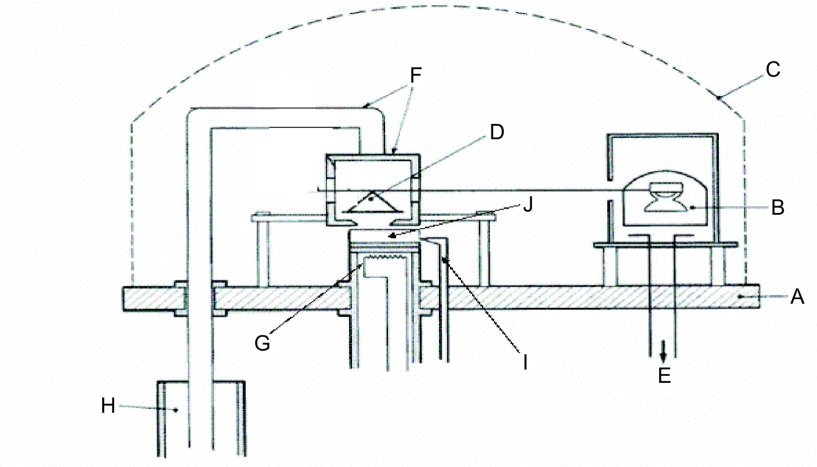
p = gőznyomás (Pa)

Az ajánlott tartomány 10^{-3}–1 Pa.

1.5.4.2. *Készülék*

A készülék működési elve az 5. ábrán látható.

5. ábra



A: Alaplemez

B: Mozgó tekercses berendezés

C: Búra

D: Mérleg serpenyővel

E: Vákuummérő műszer

F: Hűtődoboz és hűtőrúd

G: Párologtató kemence

H: Dewar-edény folyékony nitrogénnel

I: Minta hőmérsékletének mérése

J: Mérendő anyag

▼M1

1.5.5. **Effúziós eljárás: Knudsen-cella**

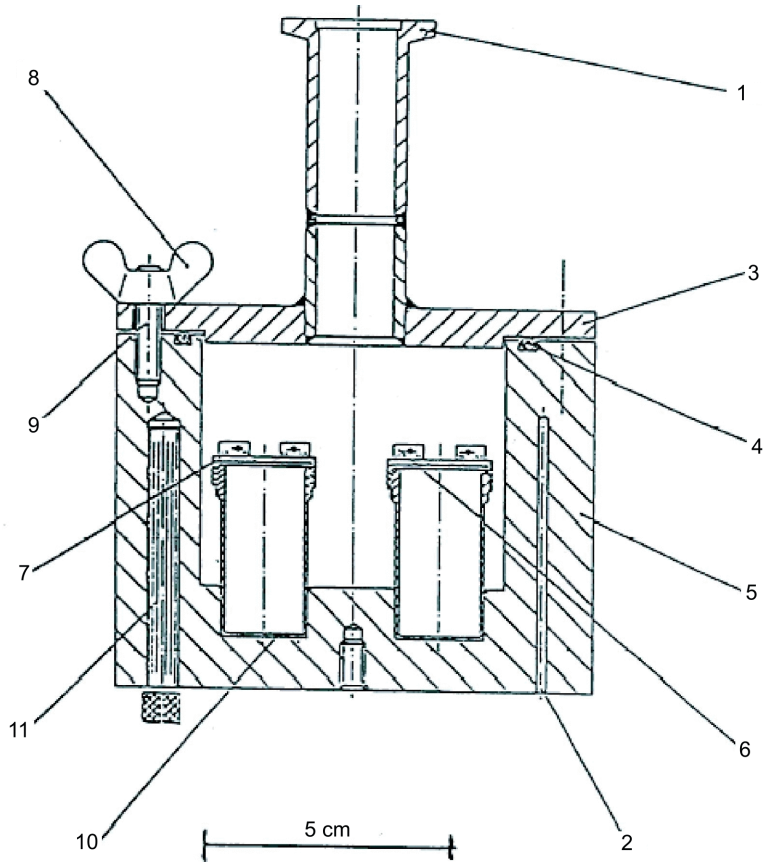
1.5.5.1. *Elv*

Az eljárás a vizsgált anyag Knudsen-cellából (8) mikronyíláson ultravákuumban egységnyi idő alatt gőz formában kilépő tömegének becslésén alapul. A kilépő gőz tömegét meghatározhatjuk a cella tömegvesztéséből, vagy úgy, hogy a gőzt kis hőmérsékleten kondenzáltatjuk, és az elpárolgott anyag mennyiségét kromatográfiásan meghatározzuk. A gőznyomást a Hertz-Knudsen összefüggésből számolhatjuk ki (lásd 1.5.4.1.), a készülék paramétereitől függő korrekciós tényezőkkel (9). Az ajánlott tartomány 10^{-10}–1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. *Készülék*

A készülék működési elve a 6.ábrán látható.

6. ábra



1: Vákuumcsatlakozás

2: Platina ellenállás-hőmérő számára, vagy hőmérsékletmérésre és -szabályozásra szolgáló furatok

3: Vákuumtartály fedele

4: O-gyűrű

5: Alumínium vákuumtartály

6: Eszköz az effúziós cellák be- és kihelyezéséhez

7: Menetes fedél

8: Szárnyas anyák

9: Csavarok

10: Effúziós cella saválló acélból

11: Fűtőbetét

▼M1

1.5.6. **Effúziós eljárás: izoterm termogravimetria**

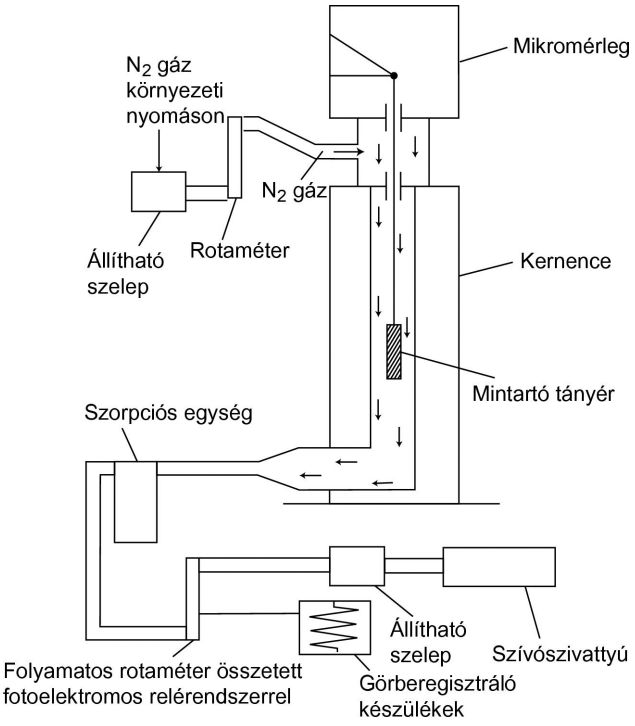
1.5.6.1. *Elv*

A módszer a vizsgált anyag nagyobb hőmérsékleten és környezeti nyomáson fellépő megnövelt párolgási sebességeinek termogravimetriás módszerrel történő meghatározásán alapul (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). A párolgási sebességeket (v_T) úgy kapjuk, hogy a kiválasztott anyagot lassan áramló inert gáznak tesszük ki, és megfigyeljük az adott T izoterm hőmérsékleten (kelvin) megfelelő időegységek alatt bekövetkező tömegveszteséget. A gőznyomást (p_T) a v_T értékekből számítjuk ki, a gőznyomás logaritmusa és a párolgási sebesség logaritmusa közötti lineáris összefüggés segítségével. Ha szükséges, a (log p_T)-(1/T) görbét regressziós analízissel extrapolálhatjuk 20 °C-ra és 25 °C-ra. Az eljárás alkalmas nagyon kicsi, 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) gőznyomású anyagok méréséhez is, de csak nagyon nagy tisztaságú (majdnem 100 %-os) anyagok esetén, elkerülendő a mért tömegvesztés hibás értelmezését.

1.5.6.2. *Készülék*

Az kísérleti készülék működési elve a 7. ábrán látható.

7. ábra



A mintatartó tányér szabályozott hőmérsékletű kamrában függ egy mikromérlegen, és száraz nitrogén gáz áramlik át rajta, amely elszállítja a mérendő anyagból elpárolgó molekulákat. A kamrából kilépő gázáramot egy abszorpciós egység tisztítja.

1.5.6.3. *Eljárás*

A mérendő anyagot homogén rétegben szétterítjük egy érdesített felületű üvegtányéron. Szilárd anyagok esetén a tányért egyenletesen benedvesítjük az anyag megfelelő oldószerben képzett oldatával, és inert gázzal megszárítjuk. A méréshez a tányért, rajta a mintával, felfüggesztjük a termogravimetriás analizátorban, és folyamatosan mérjük a tömegvesztését az idő függvényében.

▼M1

Az adott hőmérséklethez tartozó párolgási sebességet (v_T) a mintatartó tányér Δm tömegvesztéséből számítjuk a következő képlettel:

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

Ahol az F a mérendő anyag felszíne, szokásosan a mintatányér felszíne, a t pedig a Δm tömegvesztéshez tartozó időtartam.

A gőznyomás (p_T) a v_T párolgási sebesség függvényeként számolható:

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

ahol a C és D állandók, melyek az adott kísérleti elrendezésre jellemzőek és a használt mérőkamra átmérőjétől és a gáz áramlási sebességétől függenek. Ezeket az állandókat egyszer kell meghatározni, ismert gőznyomású vegyületek mérésével és a kapott (log p_T)-(log v) függvények regresszióelemzésével (11)(21)(22).

A gőznyomás (p_T)és a hőmérséklet T (kelvin) közötti összefüggést a következő egyenlet adja meg:

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

ahol A és B a (log p_T)-(1/T) függvény regresszióelemzésével kapott állandók. Az egyenlet segítségével a gőznyomás extrapolációval átszámolható bármely más hőmérsékletre.

1.5.7. **Gáztelítéses eljárás** (23)

1.5.7.1. *Elv*

Semleges gáz ismert sebességgel, szobahőmérsékleten áramlik a mintaanyag felett vagy azon keresztül, elég lassan ahhoz, hogy megtörténjen a telítődés. A gázfázis telítettségének elérése kritikus fontosságú. A gáz által szállított anyagot felfogjuk, általában abszorbenssel, és ezt a felfogott anyagmennyiséget határozzuk meg. A gőz felfogása és az azt követő analízis alternatívájaként a szállított anyag mennyiségi meghatározására folyamatos analitikai technikák is használhatók, mint például gázkromatográfia. A gőznyomás annak a feltételezésnek az alapján számítható ki, hogy érvényes az ideálisgáztörvény, és hogy a gázkeverék össznyomása megegyezik az azt alkotó gázok parciális nyomásának összegével. A mintaanyag parciális nyomása, azaz a gőznyomás az ismert össz-gáztérfogatból és a gáz által szállított anyag tömegéből számítható ki.

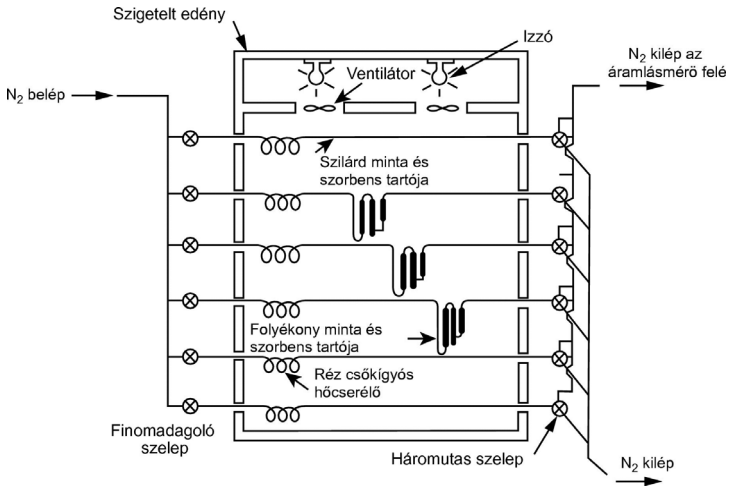
A gáztelítéses eljárás szilárd, vagy folyékony anyagok mérésére használható. Egészen 10^{-10} Pa gőznyomásig alkalmazható (10)(11)(12)(13)(14). Az eljárás 10^3 Pa gőznyomás alatt a legmegbízhatóbb. Általában 10^3 Pa felett a gőznyomás értéke túlbecsült, valószínűleg aeroszol-képződés miatt. Mivel a gőznyomás-mérés szobahőmérsékleten történik, nincs szükség nagy hőmérsékletről történő extrapolálásra – amely gyakran komoly hibákat okoz – és így az elkerülhető.

1.5.7.2. *Készülék*

Az eljárás állandó hőmérsékletű készülék használatát igényli. A 8. ábrán lévő rajzon látható készülékben három-három mintatartó van folyékony, illetve szilárd mintákhoz, ami lehetővé teszi egy szilárd vagy folyékony minta hármas elemzését. A hőmérsékletszabályozás pontossága ± 0,5 °C, vagy jobb.

▼**M1**

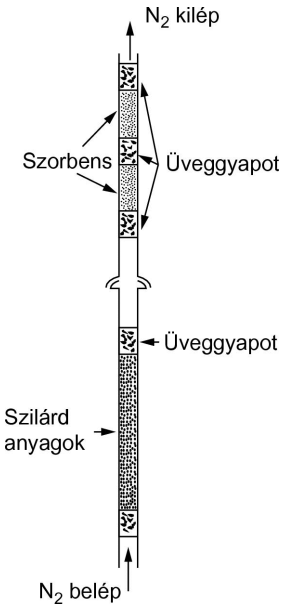
8. ábra



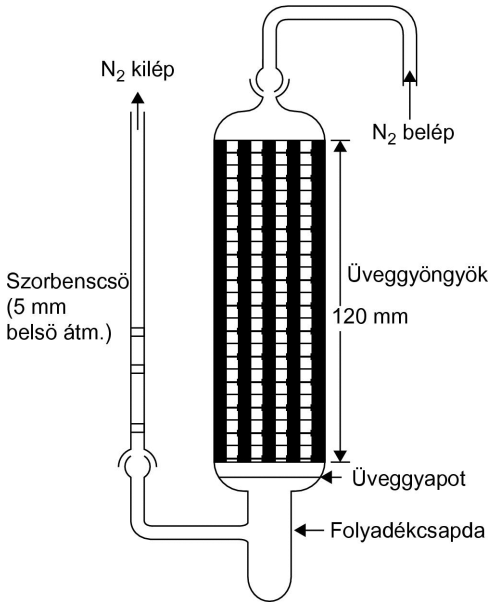
Inert vivőgázként általában nitrogént használunk, de esetenként más gáz lehet szükséges (24). A vivőgáznak száraznak kell lennie. A gázáram 6 részáramra van osztva, amelyeket tűszelep szabályoz (kb. 0,79 mm-es szelepnyílás), és 3,8 mm belső átmérőjű rézcsöveken keresztül jut be az edénybe. A hőmérséklet kiegyenlítődése után a gáz átáramlik a mintán és az abszorbensen, majd kilép a készülékből.

Szilárd mintákat 5 mm-es belső átmérőjű üvegcsőbe, üveggyapotdugók közé töltünk (9. ábra). A 10. ábrán egy folyadékminta-tartó és abszorpciós rendszer látható. Folyadékok gőznyomás-mérésének legjobban reprodukálható módszere az, hogy a folyadékot üveggyöngyre vagy inert abszorbens anyagra (pl. szilika) visszük fel, és a mintatartót ezekkel a gyöngyökkel töltjük meg. Más megoldásként a vivőgáz durva üvegszemcséken áramlik keresztül, és átbuborékol a vizsgált anyag folyadékoszlopán.

9. ábra



10. ábra



▼**M1**

Az abszorbensrendszer egy elülső és egy hátsó abszorbensszakaszból áll. Nagyon kis gőznyomáson az abszorbens csak csekély mennyiséget tart vissza és a minta és az abszorbens között lévő üveggyapoton és üvegcsövön lejátszódó abszorpció komoly probléma lehet.

Egy másik hatékony módja az elpárolgott anyag felfogásának a szárazjéggel hűtött folyadékcsapda. Nem okoz ellennyomást a telítő oszlopon, és a felfogott anyag teljes mennyisége is könnyen visszanyerhető.

1.5.7.3. *Eljárás*

A kilépő vivőgáz áramlási sebességét szobahőmérsékleten határozzuk meg. Az áramlási sebességet gyakran kell ellenőrizni a kísérlet folyamán, biztosítandó, hogy pontos érték álljon rendelkezésre a vivőgáz össztérfogatára vonatkozóan. Célszerű folyamatos ellenőrzést végezni tömegáram-mérővel. A gázfázis telítése meglehetősen hosszú tartózkodási időt igényel, így a gázáramlási sebességek meglehetősen kicsik lesznek (25).

A kísérlet végén mind az elülső, mind a hátsó abszorbensszakaszt külön-külön elemezzük. A vegyületet mindegyik szakaszban oldószer hozzáadással deszorbeáljuk. A kapott oldatokat kvantitatív elemzésnek vetjük alá az egyes szakaszokból deszorbeált mennyiségek meghatározására. A vizsgált anyag jellege szabja meg az analitikai módszer kiválasztását (illetve az abszorbens és a deszorpcióhoz használt oldószer kiválasztását is). A deszorpció hatékonyságát úgy határozzuk meg, hogy ismert mennyiségű mintát juttatunk az abszorbensre, majd deszorbeáljuk és meghatározzuk a visszanyert anyagmennyiséget. Fontos ellenőrizni a deszorpció hatékonyságát a kísérletben használt, vagy ahhoz közeli mintakoncentrációkkal.

Három különböző gázáramlási sebességet kell használni, biztosítandó, hogy a vivőgáz telítődjön a minta gőzével. Ha a számított gőznyomás-értékek azt mutatják, hogy függetlenek az áramlási sebességtől, akkor a gázt telítettnek tételezzük fel.

A gőznyomás a következő egyenletből számítható ki:

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

ahol:

p = gőznyomás (Pa)

W = elpárolgott minta tömege (g)

V = a telített gáz térfogata (m^3)

R = egyetemes gázállandó, 8,314 (J mol^{-1} K^{-1})

T = hőmérséklet (K)

M = a vizsgált anyag moláris tömege (g mol^{-1})

A mért térfogatot korrigálni kell az áramlásmérő és a telítő közötti nyomás- és hőmérsékletkülönbségekkel.

▼M1

1.5.8. **Rotoros eljárás**

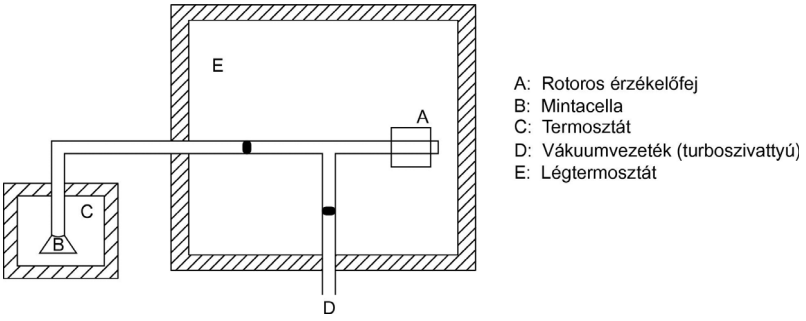
1.5.8.1. *Elv*

Ez az eljárás rotoros viszkozitásmérőt használ, amelyben a mérőelem egy mágneses térben lebegő, kis acélgolyó, amelyet forgó mágneses mező forgat (26)(27)(28). A forgási sebességét felvevőtekercsek mérik. Amikor a golyó elért egy adott fordulatszámot (rendszerint kb. 400 fordulat/sec), kikapcsoljuk a forgatómágneseket és a gázban fellépő súrlódás következtében a golyó lassulni kezd. A forgási sebesség csökkenését az idő függvényében mérjük. A gőznyomást az acélgolyó nyomásfüggő lassulásából számíthatjuk. Az ajánlott tartomány 10^{-4}–0,5 Pa.

1.5.8.2. *Készülék*

A kísérleti készülék sematikus ábrája a 11. ábrán látható. A mérőfej egy 0,1 °C pontossággal szabályozott állandó hőmérsékletű szekrényben van. A mintatartó egy külön szekrényben van, és ennek is 0,1 °C-on belül szabályozzuk a hőmérsékletét. A készülék minden más részén a hőmérsékletnek ennél nagyobbnak kell lennie, hogy elkerüljük a kondenzációt. Az egész készülék egy nagy vákuumot biztosító rendszerrel van összekapcsolva.

11. ábra



2. **ADATOK ÉS DOKUMENTÁCIÓ**

2.1. ADATOK

A fenti ELJÁRÁSOK bármelyikével kapott gőznyomást legalább két hőmérsékleten kell meghatározni. Három, vagy ennél több pont ajánlott 0–50 °C tartományban, hogy ellenőrizzük a gőznyomás-görbe linearitását. Az effúziós módszer (Knudsen-cella és izoterm termogravimetria) és a gáztelítéses módszer esetén a 0–50 °C mérési hőmérséklettartomány helyett 120–150 °C tartomány ajánlott.

2.2. MÉRÉSI JEGYZŐKÖNYV

A mérési jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell a következő információkat:

— alkalmazott módszer,

▼M1

— a minta pontos leírása (megnevezés és szennyezők), és adott esetben az előzetes tisztítási műveletek,

— legalább két gőznyomás- és hőmérsékletérték (de három vagy több ajánlott) a 0–50 °C (vagy 120–150 °C) tartományban,

— legalább egy mérésnek 25 °C-on vagy az alatt kell történnie, ha a választott módszerrel ez technikailag lehetséges,

— minden eredeti adat,

— a (log p)–(1/T) görbe,

— a gőznyomás becslése 20 vagy 25 °C-ra.

Ha átalakulás lép fel (halmazállapot-változás, bomlás), a következő információkat fel kell tüntetni jegyzőkönyvben:

— a változás jellege,

— az a hőmérséklet, ahol a változás bekövetkezett légköri nyomáson,

— gőznyomás 10 és 20c°C-kal az átalakulási hőmérséklet alatt és 10 és 20 °C-kal e hőmérséklet felett (kivéve, ha az átalakulás szilárd állapotból gáz állapotba történik).

Minden, az eredmények értelmezése szempontjából fontos információt és észrevételt fel kell tüntetni a jegyzőkönyvben, különösen a minta szennyeződéseire és az anyag fizikai állapotára vonatkozókat.

3. **IRODALOM**

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

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

▼M1

Függelék

Becslési eljárás

BEVEZETÉS

A gőznyomásra becsült értéket használhatunk a következő esetekben:

— annak eldöntésére, hogy melyik kísérleti módszer a megfelelő,

— becsült érték vagy határérték megadására, amikor a kísérleti módszer technikai okok miatt nem kivitelezhető.

BECSLÉSI MÓDSZER

Folyadékok és szilárd anyagok gőznyomása megbecsülhető a módosított Watson-korrelációval (a). Az egyetlen szükséges kísérleti adat a normál forráspont. Az eljárás a 10^{-5} Pa–10^{5} Pa tartományban alkalmazható.

Részletes információk találhatók a „Handbook of Chemical Property Estimation Methods” című kézikönyvben (b). Lásd még: OECD Environmental Monograph No. 67 (c).

SZÁMÍTÁSI ELJÁRÁS

A gőznyomás a következők szerint számolható:

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

ahol:

T = a kérdéses hőmérséklet

T_b = a normál forráspont

P_{vp} = gőznyomás a T hőmérsékleten

ΔH_{vb} = párolgási entalpia

ΔZ_b = kompresszibilitási tényező (becsült: 0,97)

m = tapasztalati tényező, a vizsgált hőmérsékleten fennálló fizikai állapottól függ

Továbbá,

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

ahol K_F egy tapasztalati tényező az anyag polaritásának figyelembevétele céljából. Néhány vegyülettípus K_F tényezője megtalálható az irodalomban (b).

▼**M1**

Elég gyakran olyan adatok állnak rendelkezésre, ahol a forráspont kisebb nyomásra van megadva. Ebben az esetben a gőznyomást a következők szerint számítjuk:

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

ahol T_1 a kisebb P_1 nyomáson mért forráspont.

DOKUMENTÁCIÓ

A becslési módszer használata esetén a jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell a számítás átfogó dokumentációját.

IRODALOM

(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. FELÜLETI FESZÜLTSÉG

1. MÓDSZER

Az itt leírt módszerek az OECD vizsgálati irányelvén alapulnak. Az alapelveket a (2) szakirodalom ismerteti.

1.1. BEVEZETÉS

A leírt módszerek vizes oldatok felületi feszültségének méréséhez alkalmazhatók.

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag vízben való oldhatóságáról, szerkezetéről, hidralizáló tulajdonságairól és a micellák képződése szempontjából kritikus koncentrációjáról.

A következő módszerek a legtöbb vegyi anyaghoz alkalmazhatók, tisztasági fokuktól függetlenül mindenfajta korlátozás nélkül.

A gyűrűs felületifeszültség-mérő módszerrel végrehajtott felületifeszültség-mérés körülbelül 200 mPa s-nél kisebb, dinamikus viszkozitású vizes oldatokra korlátozódik.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Az egységnyi területre vonatkoztatott szabad felületi entalpiát felületi feszültségnek nevezzük.

A felületi feszültséget a következőképpen adják meg:

N/m (SI-mértékegység); vagy

mN/m (SI-almértékegység);

$1 \text{ N/m} = 10^3 \text{ dyn/cm}$

1 mN/m = 1 dyn/cm az elavult CGS-rendszerben.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel nyert eredményekkel.

Az 1. és 3. szakirodalom a felületi feszültségek széles tartományát felölelő referenciaanyagokat ismertet.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A módszerek annak a maximális erőnek a mérésén alapulnak, amelyet függőlegesen kell kifejteni egy mérőcsészébe elhelyezett vizsgálandó folyadék felületével érintkező mérőkengyelre vagy gyűrűre, annak e felülettől történő elválasztása érdekében, vagy egy lemezre, amelynek egyik széle érintkezik a felülettel, a kialakult film kiemelése érdekében.

Azokat az anyagokat, amelyek legalább 1 mg/l koncentrációban oldhatók vízben, vizes oldatban vizsgálják egyetlen koncentráció mellett.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

E módszerek nagyobb pontosságra képesek, mint amelyre a környezeti értékeléshez valószínűleg szükség van.

▼B

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Elkészítik az anyag oldatát desztillált vízben. Az oldat koncentrációjának az anyag telített vizes oldatához tartozó koncentrációérték 90 %-ának kell lennie; ha ez a koncentráció meghaladja az 1 g/l értéket, 1 g/l koncentrációt használnak a vizsgálathoz. Nem kell megvizsgálni azokat az anyagokat, amelyek oldhatósága a vízben 1 mg/l-nél kisebb.

1.6.1. **Lemezes módszer**

Lásd az ISO 304 és NF T 73-060 szabványokat (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2. **Kengyeles módszer**

Lásd az ISO 304 és NF T 73-060 szabványokat (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3. **Gyűrűs módszer**

Lásd az ISO 304 és NF T 73-060 szabványokat (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4. **Az OECD által harmonizált gyűrűs módszer**

1.6.4.1. *Készülék*

E méréshez megfelelőek a kereskedelemben kapható felületifeszültség-mérők. Ezek a következő részekből állnak:

— mobil mintaasztal,

— erőmérő rendszer,

— mérőtest (gyűrű),

— mérőtartály.

1.6.4.1.1. Mobil mintaasztal

A mobil mintaasztalt a vizsgálandó folyadékot tartalmazó, szabályozott hőmérsékletű mérőtartály tartójaként használják. Az erőmérő rendszerrel együtt egy talpazatra kell felszerelni.

1.6.4.1.2. Erőmérő rendszer

Az erőmérő rendszer (lásd az ábrát) a mintaasztal fölött helyezkedik el. Az erőmérés hibájának nem szabad ± 10^{-6} N-nál nagyobbnak lennie, a tömegmérés ± 0,1 mg hibahatárának megfelelően. A kereskedelemben kapható felületifeszültség-mérő mérőskálája legtöbbször mN/m-ben lett kalibrálva azért, hogy a felületi feszültség közvetlenül mN/m-ben legyen leolvasható, 0,1 mN/m pontossággal.

▼B

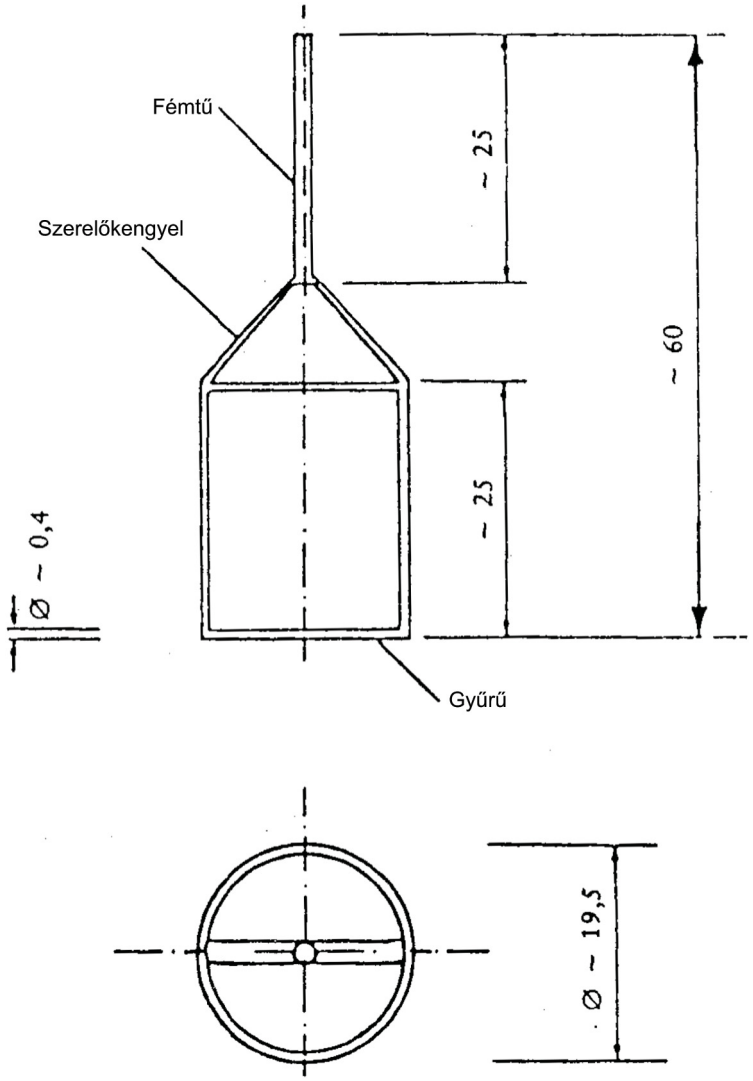
1.6.4.1.3. Mérőtest (gyűrű)

A gyűrű rendszerint körülbelül 0,4 mm vastagságú és 60 mm átlagos átmérőjű, platinairídium huzalból készül. A huzalgyűrűt vízszintesen függesztik le egy fémtűről és egy huzalszerelő kengyelről az erőmérő rendszerhez történő csatlakozás létrehozása érdekében (lásd az ábrát).

Ábra

Mérőtest

(Minden méret mm-ben van megadva)



1.6.4.1.4. Mérőtartály

A vizsgált oldatot tartalmazó mérőtartálynak szabályozott hőmérsékletű üvegtartálynak kell lennie. Úgy kell tervezni, hogy a mérés során a vizsgálandó oldat folyadékfázisának és a felszín feletti gázfázisnak a hőmérséklete állandó maradjon, és a minta ne párologhasson el. 45 mm-nél nem kisebb belső átmérőjű hengeres üvegtartályok elfogadhatók.

▼B

1.6.4.2. *A készülék előkészítése*

1.6.4.2.1. Tisztítás

Az üvegtartályokat gondosan meg kell tisztítani. Amennyiben szükséges, azokat forró króm-kénsavval és ezt követően tömény (83–98 tömegszázalékos H_3PO_4) foszforsavval kell mosni, alaposan le kell öblíteni csapvízben, és végül kétszer desztillált vízben kell mosni mindaddig, amíg semleges nem lesz, majd meg kell szárítani, és ki kell öblíteni a vizsgált folyadék egy részével.

A gyűrűt először minden vízben oldható anyag eltávolítása érdekében alaposan le kell öblíteni vízben, rövid időre be kell meríteni króm-kénsavba, le kell mosni kétszer desztillált vízzel, amíg semleges nem lesz, és végül rövid ideig melegíteni kell metanol láng fölött.

Megjegyzés:

Az olyan anyagokkal történő szennyezést, amelyek a króm-kénsavban vagy a foszforsavban nem oldódnak fel vagy nem bomlanak el – ilyenek például a szilikonok – alkalmas szerves oldószer segítségével kell eltávolítani.

1.6.4.2.2. A készülék kalibrálása

A készülék hitelesítése a nullapont ellenőrzéséből és ennek beállításából áll úgy, hogy a műszer jelzése mindig megbízható legyen mN/m-ben.

Összeszerelés:

A készüléket vízszintbe kell állítani, például a felületifeszültség-mérő alaptestére elhelyezett vízszintező segítségével, az alaplapon elhelyezett vízszintező csavarok állításával.

A nullapont beállítása:

A gyűrűnek a készülékre történő felszerelése után és a folyadékba bemerítés előtt a felületifeszültség-mérő által jelzett értéket nullára kell állítani, és ellenőrizni kell, hogy a gyűrű párhuzamos-e a folyadékfelülettel. Ehhez a folyadékfelszín tükörként használható.

Kalibráció:

A tényleges vizsgálati kalibrálás a következő két eljárás valamelyikének a segítségével hajtható végre:

a) Egy tömeg segítségével: ehhez az eljáráshoz 0,1 és 1,0 gramm közötti, ismert tömegű súlyokat helyeznek a gyűrűre. Ezt a Φ_a kalibrálási tényezőt, amellyel minden, a műszer által megadott értéket meg kell szorozni, a következő egyenletnek (1) megfelelően kell meghatározni:

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

ahol:

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

m = a súly tömege (g)

g = gravitációs gyorsulás (981 cm s^{-2} tengerszinten)

b = a gyűrű átlagos kerülete (cm)

σ_a = a felületifeszültség-mérő által mutatott érték a gyűrűn a súly elhelyezése után (mN/m).

▼B

b) Víz segítségével: az eljárásnál tiszta vizet használnak, amelynek a felületi feszültsége, például 23 °C hőmérsékleten 72,3 mN/m. Az eljárás gyorsabb a súllyal történő kalibrációnál, de mindig fennáll az a veszély, hogy a víz felületi feszültségét meghamisítják a felületaktív anyagokkal történő szennyeződési nyomok.

A Φ_b kalibrálási tényezőt, amellyel a műszer által mutatott minden értéket meg kell szorozni, a következő egyenletnek (2) megfelelően kell meghatározni:

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

ahol:

σ_o = a szakirodalomban a víz felületi feszültségére megadott érték (mN/m)

σ_g = a víz felületi feszültségének mért értéke (mN/m), mindkettő ugyanazon a hőmérsékleten.

1.6.4.3. *Minták előkészítése*

A vizsgált anyagokból vizes oldatot kell készíteni a szükséges koncentrációk használatával, és ezeknek nem szabad tartalmazniuk nem oldott anyagot.

Az oldatot állandó hőmérsékleten (± 0,5°C) kell tartani. Mivel a mérőtartályban lévő oldat felületi feszültsége változik idővel, több mérést kell végrehajtani különböző időpontokban, és fel kell rajzolni egy görbét, amely a felületi feszültséget mutatja az idő függvényében. Amennyiben további változás nem jön létre, beáll az egyensúlyi állapot.

A mérést zavarják más anyagok por és gáznemű szennyeződései. Ezért a munkát védőburkolat alatt kell végrehajtani.

1.6.5. **Vizsgálati körülmények**

A mérést körülbelül 20 °C hőmérsékleten kell végrehajtani, és a hőmérsékletet ± 0,5°C-on belül kell szabályozni.

1.6.6. **A vizsgálat végrehajtása**

A mérendő oldatokat be kell vinni a gondosan megtisztított mérőtartályba, ügyelve a habosodás elkerülésére, és ezután a mérőtartályt rá kell helyezni a vizsgálókészülék asztalára. Az asztallapot a mérőtartállyal együtt meg kell emelni, amíg a gyűrű bele nem merül az oldatba. Ezután az asztallapot fokozatosan és egyenletesen süllyeszteni kell (körülbelül 0,5 cm/perc sebességgel) a gyűrűnek a felülettől történő elválasztása érdekében, egészen a maximális erő eléréséig. A gyűrűhöz tapadt folyadékrétegnek nem szabad leválnia a gyűrűről. A mérések elvégzése után a gyűrűt újra az oldatba kell meríteni, és a mérést meg kell ismételni, amíg a kapott felületi feszültség értéke állandó nem lesz. Az oldatnak a mérőtartályba helyezéséig eltelt időt fel kell jegyezni minden egyes meghatározáshoz. Az értékek leolvasását annál a maximális erőnél kell végrehajtani, amely ahhoz szükséges, hogy elválassza a gyűrűt a folyadékfelülettől.

▼B

2. **ADATOK**

A felületi feszültség kiszámításához a készüléken mN/m-ben leolvasott értéket először meg kell szorozni (az alkalmazott kalibrálási eljárástól függően) Φ_a vagy Φ_b kalibrálási tényezővel. Az így kapott érték csak közelítőleg érvényes, és ezért helyesbíteni kell.

Harkins és Jordan (4) kísérletileg helyesbítési tényezőket határoztak meg a gyűrű méreteitől, a folyadék sűrűségétől és ennek felületi feszültségétől függő gyűrűs módszer által mért felületifeszültség-értékekhez.

Mivel munkaigényes feladat a Harkins- és Jordan-táblázatokból minden egyes méréshez a helyesbítési tényező meghatározása, vizes oldatok felületi feszültségének kiszámításához használható az egyszerűsített eljárás, nevezetesen a helyesbített felületifeszültség-értékek közvetlen kiolvasása a táblázatból (interpolálni kell a táblázatban közölt értékek közé eső értékekhez).

Táblázat:

A mért felületi feszültség helyesbítése

Csak vizes oldatokhoz, $\rho = 1\ g/cm^3$

r	= 9,55 mm (gyűrű átlagos sugara)
r	= 0,185 mm (gyűrű huzalának sugara)

Kisérleti érték (mN/m)	Helyesbített érték (mN/m)	
	Kalibráció vízre (lásd az 1.6.4.2.2. pont a) alpontja alatt)	Kalibráció vízre (lásd az 1.6.4.2.2. pont b) alpontja alatt)
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

Kisérleti érték (mN/m)	Helyesbített érték (mN/m)	
	Kalibráció vízre (lásd az 1.6.4.2.2. pont a) alpontja alatt)	Kalibráció vízre (lásd az 1.6.4.2.2. pont b) alpontja alatt)
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	—

Ezt a táblázatot a Harkins–Jordan-helyesbítés alapján állították össze. Hasonlít a DIN-szabványban (DIN 53914) lévő, vízre és vizes oldatokra (sűrűség, $\rho = 1\ g/cm^3$) vonatkozó táblázathoz, és az R = 9,55 mm (gyűrű átlagos sugara) és r = 0,185 mm (gyűrű huzalának sugara) méretekkel rendelkező, kereskedelmi forgalomban kapható gyűrűre érvényes. A táblázat tömeggel vagy vízzel végrehajtott kalibrálás után mért felületi feszültség értékek helyesbített értékeit adja meg.

Más lehetőségként, az előző kalibrálás nélkül, a felületi feszültség a következő képletnek megfelelően számítható ki:

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

ahol:

F = a film elszakadásakor a dinamométeren mért erő

R = a gyűrű sugara

f = a helyesbítési tényező (1)

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az alkalmazott módszert,

— a vizsgálathoz használt víz vagy oldat típusát,

— az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

— a mérési eredményeket: felületi feszültség (leolvasott érték), megadva mind az egyes leolvasott értékeket, mind az adott számbeli középértéket, valamint a helyesbített középértéket (a berendezés tényezőjének és a helyesbítési táblázat figyelembevételével),

▼B

— az oldat koncentrációját,

— a vizsgálati hőmérsékletet,

— a felhasznált oldat életkorát; különösen az oldat elkészítése és mérése közötti időt,

— az oldatnak a mérőtartályba helyezése után a felületi feszültség időfüggésének leírását,

— az eredmények értelmezéséhez szükséges minden információt és megjegyzést közölni kell, különösen azokat, amelyek az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosak.

3.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

Figyelembe véve, hogy a desztillált víz felületi feszültsége 72,75 mN/m 20 °C hőmérsékleten, azokat az anyagokat, amelyek 60 mN/m-nél kisebb felületi feszültséget mutatnak e módszer feltételei mellett, felületaktív anyagoknak kell tekinteni.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 115. vizsgálati irányelv, a Tanács határozata, C(81) 30 végleges.

(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. OLDHATÓSÁG VÍZBEN

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 105. vizsgálati iránymutatásában (1995) leírt módszerrel. A vizsgálati módszer az eredeti, 1981-ben elfogadott 105. vizsgálati iránymutatás átdolgozott változata. A jelenlegi és az 1981. évi változat között tartalmi különbség nincs. A módosítások elsősorban formai jellegűek. Az átdolgozás alapjául az „Oldhatóság vízben” elnevezésű európai uniós vizsgálati módszer szolgált ([1]).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

2. Egy anyag vízoldékonyságát jelentősen befolyásolhatja a szennyeződések jelenléte. Ez a vizsgálati módszer a lényegében tiszta, vízben stabil, nem illékony anyagok vízoldékonyságának megállapítására szolgál. A vízoldékonyság megállapítása előtt érdemes előzetes információkat szerezni a vizsgált anyagról, például annak szerkezeti képletéről, gőznyomásáról, disszociációs állandójáról és a pH függvényében kifejezett hidrolíziséről.

3. Ez a vizsgálati módszer két, a 10^{-2} g/l alatti, illetve feletti oldhatóságra kiterjedő módszer – az oszlopelúciós és a lombikmódszer – leírását foglalja magában. Tartalmazza emellett egy egyszerű előzetes vizsgálat leírását is. Ez utóbbi lehetővé teszi a végleges vizsgálathoz használandó minta megfelelő mennyiségének hozzávetőleges meghatározását, valamint a telítettség eléréséhez szükséges idő megállapítását.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

4. Valamely anyag vízoldékonysága az anyag adott hőmérsékleten vízben fennálló telítettségi tömegkoncentrációját jelenti.

5. A vízoldékonyságot oldott anyag tömege/oldattérfogat egységekben fejezik ki. Az SI-mértékegység a kg/m^3, azonban a g/l is használható.

REFERENCIAANYAGOK

6. Az anyagok vizsgálata során nem szükséges referenciaanyagokat alkalmazni.

A MÓDSZEREK LEÍRÁSA

Vizsgálati körülmények

7. A vizsgálatot lehetőleg 20 ± 0,5 °C hőmérsékleten kell végrehajtani. A kiválasztott hőmérsékletet állandó értéken kell tartani a berendezés minden lényeges részében.

Előzetes vizsgálat

8. Körülbelül 0,1 g, csiszolt üvegdugójú, 10 ml-es mérőhengerben lévő mintához (ha a vizsgált anyag szilárd, porítani kell) adjunk hozzá fokozatosan egyre nagyobb térfogatú, szobahőmérsékletű vizet. Minden egyes vízmennyiség hozzáadása után a keveréket 10 percig rázzuk, és szemrevételezéssel ellenőrizzük, hogy vannak-e a mintának fel nem oldott részei. Amennyiben 10 ml víz hozzáadása után a minta vagy annak egyes részei nem oldódtak fel, a kísérletet 100 ml-es mérőhengerben kell folytatni. A lenti 1. táblázatban látható az oldhatóság közelítőleges értéke azon vízmennyiség

▼M4

alatt, amelyben a minta teljesen feloldódik. Alacsony oldhatóság esetében a vizsgált anyag feloldása hosszú időt vehet igénybe, és ez esetben legalább 24 órát kell várni. Ha a vizsgált anyag 24 óra elteltével sem oldódott fel, hosszabb ideig (akár 96 óráig) kell várni, vagy további hígítással próbálkozva meg kell állapítani, hogy az oszlopelúciós vagy a lombikmódszer alkalmazandó-e.

1. táblázat

ml víz 0,1 g oldott anyaghoz	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
közelítőleges oldhatóság (g/l)	> 1 000	1 000–200	200–100	100–50	50–10	10–1	< 1

Oszlopelúciós módszer

Elv

9. Ez a módszer a vizsgált anyag vízzel, mikrooszlopból végrehajtott elúcióján alapul; az oszlop a vizsgált anyag feleslegével előzetesen bevont inert hordozóanyaggal van megtöltve (2). A vízoldékonyságot az eluátum tömegkoncentrációja határozza meg, amikor az koncentrációplatót ér el az idő függvényében.

Készülék

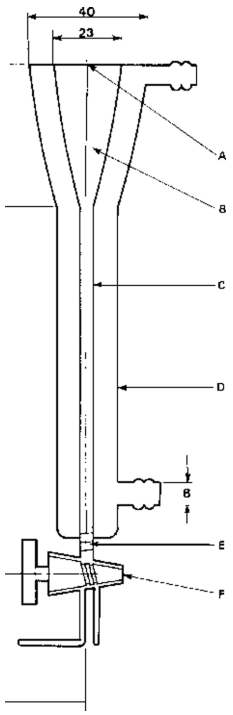
10. A készülék egy állandó hőmérsékleten tartott mikrooszlopból áll (1. ábra). A mikrooszlop vagy egy újrakeringtető szivattyúhoz (2. ábra), vagy egy kiegyenlítő tartályhoz (3. ábra) csatlakozik. A mikrooszlop inert hordozóanyagot tartalmaz, amelyet egy, a részecskék kiszűrésére is szolgáló, kisméretű üveggyapotdugó rögzít. Hordozóanyagként üveggyöngy, kovaföld vagy egyéb inert anyagok alkalmazhatók.

11. Az 1. ábrán egy, az újrakeringtető szivattyúhoz való csatlakoztatásra alkalmas mikrooszlop látható. A mikrooszlop öt (a kísérlet elején kiöntött) tartálytérfogat és öt (a kísérlet során elemzési célból eltávolított) minta tárolására alkalmas töltőtérrel rendelkezik. Más megoldásként kisebb méret is alkalmazható, ha a kísérlet során víz tölthető a rendszerbe a szennyeződésekkel eltávolított öt kezdeti tartálytérfogat pótlására. Az oszlop inert anyagból készült csövön keresztül csatlakozik a körülbelül 25 ml/h áramlási sebesség elérésére képes újrakeringtető szivattyúhoz. Az újrakeringtető szivattyú például perisztaltikus szivattyú vagy membránszivattyú lehet. Gondoskodni kell arról, hogy a cső anyaga ne okozzon semmilyen szennyeződést és/vagy adszorpciót.

12. A 3. ábrán egy kiegyenlítő tartályt alkalmazó megoldás vázlatos elrendezése látható. Ebben az elrendezésben a mikrooszlop egyirányú üvegcsappal van ellátva. A kiegyenlítő tartállyal való összeköttetést egy csiszolt üvegből készült csatlakozó és inert anyagból készült csővezeték biztosítja. A kiegyenlítő tartályból való áramlás sebessége körülbelül 25 ml/óra kell, hogy legyen.

▼**M4**

1. ábra



A méretek mm-ben értendők.

A. Csiszolt üveg csatlakozó csatlakoztatási helye

B. Felső tér

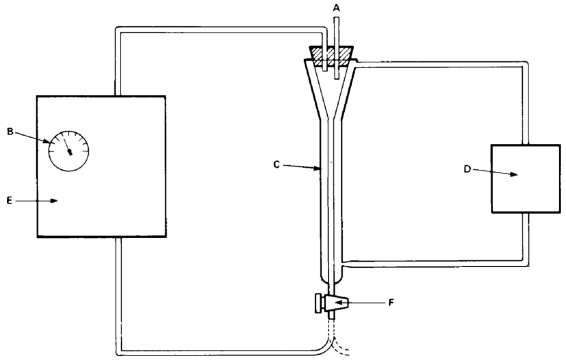
C. Belső rész (5)

D. Külső rész (19)

E. Üveggyapot dugó

F. Üvegcsap

2. ábra



A. Atmoszférikus egyensúlyba hozatal

B. Áramlásmérő

C. Mikrooszlop

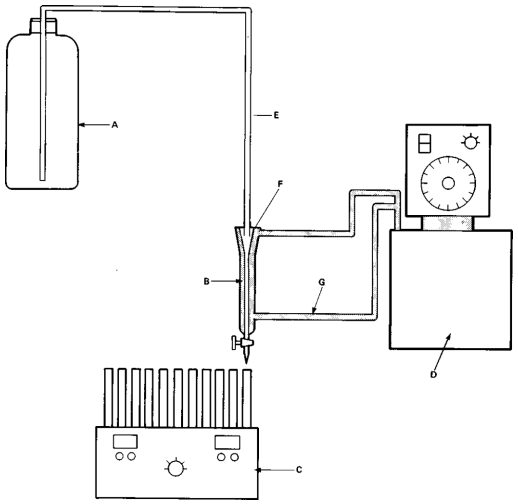
D. Szabályozott hőmérsékletű keringtető szivattyú

E. Újrakeringtető szivattyú

F. Kétállású szelep mintavételhez

▼M4

3. ábra



A. Kiegyenlítő tartály (például 2,5 literes lombik)

B. Oszlop

C. Frakciógyűjtő

D. Termosztát

E. Tefloncső

F. Csiszolt üveg csatlakozó

G. Vízvezeték (a termosztát és az oszlop között, belső átmérője körülbelül 8 mm)

13. Töltsünk körülbelül 600 mg hordozóanyagot egy 50 ml-es gömblombikba. Oldjunk fel kellő mennyiségű vizsgált anyagot analitikai tisztaságú illékony oldószerben, és ebből az oldatból megfelelő mennyiséget adjunk hozzá a hordozóanyaghoz. Az oldószert teljesen párologtassuk el, például forgó párologtatóval, mivel egyébként az elúciós lépés során a felületen jelentkező megoszlás miatt nem érhető el a hordozóanyag vízzel történő telítése. A megtöltött hordozóanyagot két órán át áztassuk körülbelül 5 ml vízben, és ezután a szuszpenziót töltsük a mikrooszlopba. Más megoldásként száraz megtöltött hordozóanyag önthető a vízzel teli mikrooszlopba, és körülbelül két óra alatt hozható egyensúlyba.

14. A hordozóanyag megtöltése problémákat, és következésképpen hibás eredményeket okozhat, például ha a vizsgált anyag olajos fázisként leülepszik. Ezeket a problémákat ki kell vizsgálni, és a részleteket jegyzőkönyvbe kell venni.

Eljárás újrakeringtető szivattyú használata esetén

15. Indítsuk el az áramlást az oszlopon keresztül. Az ajánlott áramlási sebesség körülbelül 25 ml/óra, ami az itt leírt oszlop esetében 10 tartálytérfogat/óra sebességnek felel meg. Legalább az első öt tartálytérfogatot öntsük ki, hogy eltávolítsuk a vízben oldható szennyeződéseket. Ezt követően a szivattyút az egyensúlyi állapot létrejöttéig hagyjuk működni öt olyan, egymást követő, véletlenszerűen választott minta felhasználásával, amelyek koncentrációja nem tér el egymástól ± 30 %-nál nagyobb mértékben. E minták levétele között legalább tíz tartálytérfogat áthaladásának megfelelő időnek kell eltelnie. Az alkalmazott analitikai módszertől függően ajánlatos lehet az egyensúlyi állapot létrejöttét koncentráció/idő görbével ábrázolni.

▼M4

Eljárás kiegyenlítő tartály használata esetén

16. Az egymást követő eluátumfrakciókat össze kell gyűjteni, és elemezni kell a kiválasztott módszerrel. Az oldhatóság meghatározására abból a középső eluátumtartományból származó frakciókat használjuk, ahol a koncentrációk legalább öt egymást követő frakcióban ± 30 %-on belül állandóak.

17. Az ajánlott eluáló anyag a kétszer desztillált víz. 10 megohm/cm feletti ellenállású és 0,01 % alatti összes szerves széntartalmú deionizált víz is használható.

18. Mindkét eljárás esetében egy második méréssorozatot is végre kell hajtani az első méréssorozat áramlási sebességének felét alkalmazva. Amennyiben a két méréssorozat eredményei megegyeznek egymással, a vizsgálat kielégítő. Ha a kisebb áramlási sebesség mellett nagyobb a mért oldhatóság, az áramlási sebesség felezését folytatni kell, amíg két egymást követő méréssorozat azonos oldhatóságot nem ad.

19. Mindkét eljárás során a Tyndall-jelenség előfordulásának vizsgálatával ellenőrizni kell, hogy a frakciókban nincs-e jelen kolloidanyag. Részecskék jelenléte esetén a vizsgálat érvénytelennek tekintendő, és az oszlop szűrési hatásának javítását követően megismétlendő.

20. Meg kell mérni minden egyes minta pH-ját, lehetőleg különleges indikátorpapírral.

Lombikmódszer

Elv

21. A vizsgált anyagot (a szilárd anyagokat porítani kell) oldjuk fel a vizsgálati hőmérsékletnél némileg magasabb hőmérsékletű vízben. A telítés elérésekor hűtsük le a keveréket, és tartsuk a vizsgálati hőmérsékleten. Más megoldásként – ha megfelelő mintavételezéssel meggyőződtünk a telítettségi egyensúly létrejöttéről – a mérés közvetlenül a vizsgálati hőmérsékleten is végrehajtható. Ezt követően alkalmas analitikai módszerrel határozzuk meg a vizsgált anyag tömegkoncentrációját a vizes oldatban, amely nem tartalmazhat fel nem oldott részecskét (3).

Készülék

22. A következő felszerelések szükségesek:

— szokásos laboratóriumi üvegeszközök és műszerek,

— oldatok szabályozott, állandó hőmérséklet melletti keverésére alkalmas készülék,

— centrifuga (lehetőleg szabályozott hőmérsékletű), ha emulziókhoz szükséges, és

— analitikai felszerelés.

Eljárás

23. Az előzetes vizsgálat alapján becsléssel határozzuk meg a vizsgált anyag kívánt vízmennyiség telítéséhez szükséges mennyiségét. E mennyiségnek körülbelül ötszörösét mérjük be a három, becsiszolt üvegdugóval felszerelt üvegedénybe (például centrifuga-kémcsőbe, lombikba). Az analitikai módszer és az oldhatósági tartomány függvényében kiválasztott vízmennyiséget töltsük be az egyes edényekbe. Az edényeket szorosan dugózzuk le, majd 30 °C hőmérsékleten rázzuk össze. Állandó hőmérsékleten való működésre képes rázó- vagy keverőkészüléket, például szabályozott hőmérsékletű vízfürdőben elhelyezett mágneses keverőberendezést kell használni. Egy nap eltelte után az egyik edényt vizsgálati hőmérsékleten 24 óráig hagyjuk egyensúlyi állapotba állni, és időnkénti rázzuk fel. Az edény tartalmát ezután vizsgálati hőmérsékleten centrifugáljuk, és alkalmas analitikai módszerrel határozzuk meg a vizsgált anyag koncentrációját a tiszta,

▼M4

átlátszó vizes fázisban. A másik két lombikot hasonlóan kezeljük a kezdeti, 30 °C hőmérsékleten két, illetve három napon át végrehajtott egyensúlyba hozatal után. Amennyiben legalább az utolsó két edény vizsgálata során mért koncentrációk legfeljebb 15 %-kal térnek el egymástól, a vizsgálat kielégítő. Ha az 1., 2. és 3. edényből kapott eredmények növekvő tendenciájúak, a teljes vizsgálatot meg kell ismételni hosszabb egyensúlyba hozatali idő alkalmazásával.

24. A vizsgálat 30 °C-on végrehajtott előzetes inkubáció nélkül is végrehajtható. A telítési egyensúly beállítása sebességének becsléséhez vegyünk mintákat mindaddig, amíg a keverési idő már nincs hatással a mért koncentrációra.

25. Meg kell mérni minden egyes minta pH-ját, lehetőleg különleges indikátorpapírral.

Analitikai meghatározások

26. Előnyben részesítendő az anyagspecifikus módszer, mivel a kis mennyiségekben jelen lévő oldható szennyeződések jelentős hibákat okozhatnak a mért oldhatóságban. Ilyen módszer például a gáz- vagy folyadékkromatográfia, a titrálás, a fotometria, a voltametria.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

Oszlopelúciós módszer

27. Minden egyes méréssorozatból ki kell számítani a telítési plató legalább öt egymást követő mintájának középértékét, valamint a szórást. A különböző áramlási sebességgel végrehajtott két vizsgálatban kapott középértékek legfeljebb 30 %-kal térhetnek el egymástól.

Lombikmódszer

28. A három lombiknál kapott egyes eredményeket, amelyek legfeljebb 15 %-kal térhetnek el egymástól, átlagoljuk.

Vizsgálati jegyzőkönyv

Oszlopelúciós módszer

29. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

— az előzetes vizsgálat eredményei,

— kémiai azonosság és szennyeződések (adott esetben az előzetes tisztítási művelet),

— minden egyes minta koncentrációja, áramlási sebessége és pH-ja,

— minden egyes méréssorozat telítettségi platója legalább öt mintájának középértékei és szórása,

— legalább két egymást követő méréssorozat átlaga,

— a víz hőmérséklete a telítési folyamat során,

— az elemzési módszer,

— a hordozóanyag jellege

— a hordozóanyag betöltése,

— a felhasznált oldószer,

— az anyag vizsgálat során észlelt bármilyen kémiai instabilitásának bizonyítéka,

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden információ, különösen a vizsgált anyag szennyeződéseivel és halmazállapotával kapcsolatban.

▼**M4**

Lombikmódszer

30. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

— az előzetes vizsgálat eredményei,

— kémiai azonosság és szennyeződések (adott esetben az előzetes tisztítási művelet),

— az egyes analitikai meghatározások és azok átlagai, ha egynél több értéket határoztunk meg az egyes lombikokhoz,

— minden minta pH-ja,

— az egymással egyező, különböző lombikokból kapott értékek átlaga,

— a vizsgálati hőmérséklet,

— az analitikai módszer,

— az anyag vizsgálat során észlelt bármilyen kémiai instabilitásának bizonyítéka,

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden információ, különösen a vizsgált anyag szennyeződéseivel és halmazállapotával kapcsolatban.

SZAKIRODALOM

(1) A Bizottság 1992. július 31-i 92/69/EGK irányelve a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló 67/548/EGK tanácsi irányelvnek a műszaki fejlődéshez történő tizenhetedik hozzáigazításáról, HL L 383., 1992.12.29., 113. o.

(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. MEGOSZLÁSI HÁNYADOS

1. MÓDSZER

Az itt leírt „lombikrázásos” módszer az OECD vizsgálati irányelven (1) alapul.

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag szerkezeti képletéről, disszociációs állandójáról, vízben oldhatóságáról, hidrolíziséről, n-oktanol oldhatóságáról és felületi feszültségéről.

Ionizálható anyagokon a méréseket csak nem ionos formájukban (szabad sav vagy szabad bázis) szabad végrehajtani, amelyet legalább egy pH-egységgel a pK alatti (szabad sav) vagy feletti (szabad bázis) pH-jú, megfelelő puffer használatával hoznak létre.

Ez a vizsgálati módszer két különálló eljárást foglal magában: a lombikrázásos módszert és a nagynyomású folyadékkromatográfiát („high performance liquid chromatography”, HPLC). Az előbbi akkor alkalmazható, amikor a P-érték (a meghatározásokat lásd lejjebb) a –2 és + 4 közötti tartományba, és az utóbbi a 0 és 6 közötti tartományba esik. A kísérleti eljárások közül bármelyik végrehajtása előtt először a megoszlási hányados előzetesen becsült értékét kell megállapítani.

A lombikrázásos módszer csak vízben és n-oktanolban oldható, lényegében tiszta anyagokhoz alkalmazható. Nem alkalmazható felületaktív anyagok esetében (amelyekhez biztosítani kell az egyedi n-oktanol- és vízoldékonyságon alapuló becsült vagy számított értéket).

A HLPC-módszer nem alkalmazható erős savak és lúgok, komplex fémvegyületek, felületaktív anyagok és olyan anyagok esetében, amelyek az eluáló anyagokkal reakcióba lépnek. Ezen anyagok esetében egyedi n-oktanol- és vízoldékonyságon alapuló, becsült vagy számított értéket kell biztosítani.

A HPLC-módszer kevésbé érzékeny a vizsgálandó vegyületben lévő szennyeződések jelenlétére, mint a lombikrázásos módszer. Ennek ellenére bizonyos esetekben a szennyeződések megnehezíthetik az eredmények értelmezését, mivel bizonytalanná válik a csúcs kijelölése. Olyan keverékek esetében, amelyek határozatlan sávot eredményeznek, meg kell adni a log P felső és alsó határát.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁS ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A megoszlási hányados (P) két, egymással nem elegyedő oldószerből álló, kétfázisú rendszerben feloldott anyag egyensúlyi koncentrációinak (c_i) aránya. N-oktanol és víz esetében:

$$p_{ow} = \frac{C_{n-oktanol}}{C_{víz}}$$

A megoszlási hányados (P) két koncentráció hányadosa, és rendszerint 10-es alapú logaritmus (log P) alakjában adják meg.

▼B

1.3. REFERENCIAANYAGOK

A lombikrázásos módszer

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel nyert eredményekkel.

A HPLC-módszer

Valamely vegyület mért HPLC-adata és annak P-értéke korrelációba állításához létre kell hozni a kromatográfiai adatok függvényében a log P kalibrációs görbéjét legalább 6 referenciapontot használva. A felhasználó feladata a megfelelő referenciaanyagok kiválasztása. Amikor csak lehetséges, legalább egy referenciavegyületnek a vizsgált anyag P_{ow}-je fölötti, és egy másiknak a vizsgált anyag P_{ow}-je alatti P_{ow}-vel kell rendelkeznie. Négynél kisebb log P-értékek esetében a kalibráció a lombikrázásos módszerrel kapott adatokon alapulhat. Négynél nagyobb log P-értékekhez a kalibráció szakirodalmi értékeken alapulhat, amennyiben ezek összhangban vannak a számított értékekkel. Nagyobb pontosság elérésére előnyben kell részesíteni az olyan referenciavegyületeket, amelyek szerkezetileg kapcsolatban vannak a vizsgált anyaggal.

Sok vegyi anyagcsoport esetében a log P_{ow}-értékek terjedelmes jegyzékei állnak rendelkezésre (2) (3). Amennyiben a szerkezetileg egymással összefüggésben lévő vegyületek megoszlási hányadosairól nem állnak rendelkezésre adatok, más referenciavegyületekkel végrehajtott általánosabb kalibrálás használható.

A javasolt referenciaanyagok és azok P_{ow}-értékeinek jegyzékét a 2. függelék tartalmazza.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

1.4.1. **A lombikrázásos módszer**

A megoszlási hányados meghatározásához egyensúlyt kell teremteni a rendszer valamennyi, egymással kölcsönhatásban lévő komponense között, és meg kell határozni a két fázisban feloldott anyagok koncentrációit. Az ezzel a témakörrel foglalkozó szakirodalom vizsgálata azt jelzi, hogy többféle különböző módszer használható ennek a problémának a megoldására, azaz a két fázis alapos keverésére, amelyet a szétválasztásuk követ a vizsgált anyag egyensúlyi koncentrációjának meghatározására.

1.4.2. **A HPLC-módszer**

A HPLC-t olyan, a kereskedelemben kapható szilárd fázissal megtöltött analitikai oszlopokon hajtják végre, amely kémiailag kovasavhoz kötött hosszú szénhidrogénláncokat (például C_8, C_{18}) tartalmaz. Az oszlopba befecskendezett vegyi anyagok különböző sebességekkel mozognak az oszlop mentén a mozgó fázis és az álló szénhidrogénfázis közötti, különböző mértékű megoszlásuk miatt. A vegyi anyagok keverékei a víztaszító képességük sorrendjében eluálódnak, úgy, hogy először a vízben oldható vegyi anyagok eluálódnak, és utoljára az olajban oldható vegyi anyagok, a szénhidrogén-víz megoszlási hányadosukkal arányosan. Ez lehetővé teszi az ilyen (fordított fázisú) oszlopon a retenciós idő és az n-oktanol/víz megoszlási hányados közötti összefüggés meghatározását. A megoszlási hányados a következő kifejezés által megadott „k” *kapacitási faktor* segítségével határozható meg.

▼B

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

amelyben t_r = a vizsgált anyag retenciós ideje, és t_0 = az az átlagos idő, amelyre egy oldószer-molekulának szüksége van ahhoz, hogy keresztülhaladjon az oszlopon (holtidő).

Kvantitatív analitikai módszerek nem szükségesek, és csak az elúciós időket kell meghatározni.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

1.5.1. **Ismételhetőség**

A lombikrázásos módszer

A megoszlási hányados pontosságának biztosítása érdekében két meghatározást kell végrehajtani három különböző vizsgálati körülmény között, amelyek során változtatható az előírt anyagmennyiség, valamint az oldószertérfogatok aránya. A megoszlási hányados 10-es alapú logaritmusban kifejezett értékeinek ± 0,3 logegység-tartományon belül kell lennie.

A HPLC-módszer

A mérés megbízhatóságának növelésére két meghatározást kell végrehajtani. Az egyes mérésekből meghatározott log P értékeknek ± 0,1 logegység-tartományon belül kell lenniük.

1.5.2. **Érzékenység**

A lombikrázásos módszer

A módszer mérési tartományát az analitikai eljárás detektálási határa határozza meg. Ennek lehetővé kell tennie a –2 és + 4 (esetenként, amikor teljesülnek ennek a feltételei, ez a tartomány egészen 5-ös log P_{ow}-re is kibővíthető) közötti tartományban lévő log P_{ow} értékek kiértékelését, amennyiben az oldatban lévő anyag koncentrációja egyik fázisban sem több 0,01 mol/liternél.

A HPLC-módszer

A HPLC-módszer 0 és 6 közötti log P_{ow} tartományban teszi lehetővé a megoszlási hányadosok becslését.

Általában valamely vegyület megoszlási hányadosa a lombikrázásos értéktől számított ± 1 logegységen belül becsülhető meg. A jellegzetes korrelációk megtalálhatók a szakirodalomban (4) (5) (6) (7) (8). Nagyobb pontosság rendszerint akkor érhető el, amikor a korrelációs görbék egymással szerkezetileg kapcsolatban lévő referenciavegyületeken alapulnak (9).

▼B

1.5.3. **Alkalmazhatóság**

A lombikrázásos módszer

A Nernst-féle megoszlási törvény csak állandó hőmérsékleten, nyomáson és pH mellett érvényes híg oldatokra. Szigorúan két tiszta oldószer között diszpergálódott tiszta anyagra érvényes. Amennyiben egyidejűleg több különböző oldott anyag van jelen egy vagy több fázisban, ez hatással lesz az eredményekre.

Az oldott molekulák disszociációja vagy asszociációja eltéréseket eredményez a Nernst-féle megoszlási törvénytől. Az ilyen eltéréseket az a tény jelzi, hogy a megoszlási hányados függővé válik az oldat koncentrációjától.

Mivel többszörös egyensúlyról van szó, ezt a módszert nem szabad alkalmazni ionizálható vegyületekre helyesbítés alkalmazása nélkül. Ilyen vegyületek esetében meg kell fontolni pufferoldatok használatát víz helyett; a puffer pH-jának legalább 1 pH-egységgel el kell térnie az anyag pKa-értékétől, és figyelembe kell venni ennek a pH-nak az összefüggését a környezettel.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **A megoszlási hányados előzetes becslése**

A megoszlási hányados becslését lehetőleg számítási módszer (lásd az 1. függeléket) segítségével, vagy adott esetben a tiszta oldószerekben lévő vizsgált anyag oldhatóságainak arányából (10) kell végrehajtani.

1.6.2. **A lombikrázásos módszer**

1.6.2.1. *Előkészület*

n-oktanol: a megoszlási hányados meghatározását nagy tisztaságú, analitikai minőségű reagenssel kell végrehajtani.

Víz: üveg- vagy kvarckészülékben lévő desztillált vagy kétszer desztillált vizet kell használni. Ionizálható vegyületekhez víz helyett pufferoldatokat kell használni, amennyiben indokolt.

Megjegyzés:

Nem szabad közvetlenül valamilyen ioncserélőből vett vizet használni.

1.6.2.1.1. Az oldószerek előzetes telítése

Valamely megoszlási hányados meghatározása előtt kölcsönösen telítik az oldószerrendszer fázisait a kísérleti hőmérsékleten végrehajtott rázással. Ennek végrehajtásához célszerű 24 órán át egy mechanikus rázókészülékben nagy tisztaságú, analitikai minőségű n-oktanolt vagy vizet tartalmazó két olyan, nagy tárolópalackot rázni, amelyek közül mindkettő elegendő mennyiséget tartalmaz a másik oldószerből, és ezután ezeket addig kell alkalmazni, amíg a fázisok szétválnak, és bekövetkezik a telítettségi állapot.

▼B

1.6.2.1.2. Előkészület a vizsgálathoz

A kétfázisú rendszer teljes mennyiségének majdnem meg kell töltenie a vizsgálati tartályt. Ez segíteni fog az elillanás miatti anyagveszteség megakadályozásában. Az alkalmazandó térfogatarányt és anyagmennyiségeket a következők határozzák meg:

— a megoszlási hányados előzetes értékelése (lásd fent),

— az analitikai eljáráshoz szükséges vizsgált anyag minimális mennyisége, és

— a mindkét fázisban 0,01 mol/literes maximáliskoncentráció-korlátozás.

Három vizsgálatot kell végezni. Az elsőben az n-oktanol és víz számított térfogatarányát használják; a másodikban ezt az arányt kettővel elosztják; és a harmadikban ezt az arányt kettővel megszorozzák (például, 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Vizsgált anyag

Törzsoldatot készítenek vízzel előre telített n-oktanolban. Ennek a törzsoldatnak a koncentrációját pontosan meg kell határozni, mielőtt a megoszlási hányados meghatározásához használnánk. Ezt az oldatot olyan körülmények között kell tárolni, amely biztosítja annak stabilitását.

1.6.2.2. *Vizsgálati körülmények*

A vizsgálati hőmérsékletet állandó értéken (± 1 °C) kell tartani, és ennek a 20 és 25 °C közötti tartományban kell lennie.

1.6.2.3. *Mérési eljárás*

1.6.2.3.1. A megoszlási egyensúly létrehozása

Minden vizsgálati körülményhez elő kell készíteni a pontosan megmért két oldószermennyiséget, valamint a szükséges törzsoldatmennyiséget tartalmazó vizsgálati tartályt.

Az n-oktanol-fázisokat térfogat alapján kell mérni. A vizsgálati tartályokat vagy alkalmas rázókészülékbe kell helyezni, vagy kézzel kell keverni. Centrifugakémcső használatakor javasolt módszer a kémcső gyors forgatása 180 fokban a főtengelye mentén úgy, hogy minden oldott levegő távozzék a két fázisból. A tapasztalat azt mutatja, hogy 50 ilyen forgatás rendszerint elegendő a megoszlási egyensúly létrehozásához. Azért, hogy bizonyosan létrejöjjön az egyensúly, öt perc alatt 100 forgatás ajánlott.

1.6.2.3.2. Fáziselkülönítés

Adott esetben a fázisok elkülönítéséhez a keveréket centrifugálni kell. Ezt a műveletet szobahőmérsékleten, laboratóriumi centrifugában kell elvégezni, vagy ha nem szabályozott hőmérsékletű centrifugát használnak, a centrifugakémcsöveket az elemzés előtt legalább egy óra hosszat egyensúlyban kell tartani a vizsgálati hőmérsékleten.

▼B

1.6.2.4. *Elemzés*

A megoszlási hányados meghatározásához meg kell határozni a vizsgált anyag koncentrációját mindkét fázisban. Ez úgy tehető meg, hogy ki kell venni minden egyes vizsgálati körülményhez tartozó minden egyes kémcsőből mindkét fázis aliquot részét, és elemezni kell azokat a kiválasztott eljárással. Ezután ki kell számítani a mindkét fázisban jelen lévő teljes anyagmennyiséget, és ezt össze kell hasonlítani az eredetileg bevitt anyagmennyiséggel.

A vizes fázisból olyan eljárással kell mintát venni, amely minimálissá teszi az n-oktanol maradéka bevitelének veszélyét: a vizes fázisból a mintavételhez egy eltávolítható tűvel ellátott üvegfecskendő használható. A fecskendőt kiinduláskor részben meg kell tölteni levegővel. A levegőt óvatosan ki kell tolni, miközben a tűt behelyezik az n-oktanol-rétegen keresztül. Ezután megfelelő mennyiségű vizes fázist kell beszívni a fecskendőbe. A fecskendőt gyorsan el kell távolítani az oldatból, és le kell venni a tűt. A fecskendő tartalma ezután vizes mintaként használható. A két elkülönített fázisban a koncentrációt lehetőleg valamilyen, anyagra jellemző módszerrel kell meghatározni. A következő felsorolás példákat ad azokra az analitikai módszerekre, amelyek megfelelőnek bizonyulhatnak:

— fotometrikus módszerek,

— gázkromatográfia,

— nagy nyomású folyadékkromatográfia.

1.6.3. **A HPLC-módszer**

1.6.3.1. *Előkészület*

Készülék

Impulzusmentes szivattyúval és alkalmas detektáló készülékkel felszerelt folyadékkromatográf szükséges. Injektáló hurokkal rendelkező injektor használata ajánlatos. Álló fázisban poláros csoportok jelenléte nagymértékben károsíthatja a HPLC-oszlop megfelelő működését. Ezért az álló fázisnak minimális százalékban szabad csak tartalmaznia poláros csoportokat (11). A kereskedelemben kapható mikroszemcsés, reverz fázisú töltetek vagy előretöltött oszlopok is használhatók. Az injektáló rendszer és az analitikai oszlop közé védőoszlop helyezhető el.

Mobil fázis

Eluáló oldószer elkészítésére HPLC-minőségű metanolt és HPLC-minőségű vizet használnak, amelyet gáztalanítanak használat előtt. Izokratikus eluálást kell alkalmazni. Minimum 25 % víztartalmú metanol/víz arányt kell használni. Általában 3:1 (térfogat/térfogat) metanol-víz keverék megfelelő log P = 6 vegyületek 1 órán belüli eluálásához 1 ml/perc átfolyási sebesség mellett. Ha a vegyület log P-je nagy, szükségessé válik az elúciós idő lerövidítése (referenciavegyületeknél is) a mobil fázis polaritásának vagy az oszlop hosszúságának csökkentésével.

A n-oktanolban nagyon kis mértékben oldható anyagok hajlamosak arra, hogy rendkívül alacsony log P_{ow}-értékeket adjanak a HPLC-módszerrel; az ilyen vegyületek csúcsai esetenként az oldószerfronttal együtt jelentkeznek. Ez valószínűleg annak tulajdonítható, hogy túl lassú a megoszlási folyamat ahhoz, hogy létrejöhessen az egyensúly az alatt az idő alatt, amíg általában egy HPLC-elválasztás tart. Az áramlási sebesség csökkentése vagy a metanol/víz arány csökkentése hatásos lehet abban, hogy reális értéket kapjanak.

▼B

A vizsgált, és a referenciavegyületeknek elegendő koncentrációkban oldhatóaknak kell lenniük a mobil fázisban ahhoz, hogy kimutathatók legyenek. Csak kivételes esetekben használhatók adalékanyagok a metanol/víz keverékhez, mivel az adalékanyagok megváltoztatják az oszlop tulajdonságait. Adalékanyagokkal rendelkező kromatogramokhoz kötelező az ugyanolyan típusú, külön oszlop használata. Amennyiben nem megfelelő a metanol-víz, más szerves oldószer-víz keverékek használhatók, például etanol-víz vagy aceto-nitril-víz.

Az eluáló folyadék pH-ja döntő fontosságú ionizálható vegyületek esetében. Ennek belül kell lennie az oszlop üzemi pH-tartományán, ami rendszerint 2 és 8 között van. Ajánlatos a pufferolás. El kell kerülni a só kicsapódását és az oszlop minőségromlását, amely bizonyos szerves fázis/puffer keverékek esetében megvalósulhat. Nem ajánlatos kovasav alapú, álló fázisú HPLC-berendezéssel pH 8 felett méréseket végrehajtani, mivel a lúgos mobil fázis használata gyors romlást okozhat az oszlop teljesítőképességében.

Oldott anyagok

A referenciavegyületeknek a lehető legtisztább vegyületeknek kell lenniük. A vizsgálatra vagy kalibrálásra szánt vegyületeket, amennyiben lehetséges, feloldják a mobil fázisban.

Vizsgálati körülmények

A mérések során a hőmérsékletnek nem szabad ± 2 K-nél nagyobb értékkel változnia.

1.6.3.2. **Mérés**

A t_0 holtidő számítása

A t_0 holtidő valamely homológ sor (például n-alkil-metil-ketonok) vagy kromatográffal nem késleltetett szerves vegyületek (például tiokarbamid vagy formamid) segítségével határozható meg. A t_0 holtidőnek homológ sor segítségével végrehajtott számításához valamely homológ sornak legalább hét tagját fecskendezik be, és meghatározzák a megfelelő holtidőt. Felrajzolják a $t_{r\ (n\ c\ +\ 1)}$ alapretenciós időt a $t_{r(n\ c)}$ függvényében, és meghatározzák a következő regressziós egyenletet:

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

„a” metszéspontját és „b” meredekségét (n = szénatomok száma). A t_0 holtidőt ekkor a következő összefüggés adja meg:

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

▼B

Kalibrációs görbe

A következő lépés a log P függvényében a log k-értékek korrelációjának megállapítása megfelelő referenciaanyagok esetében. A gyakorlatban egyidejűleg fecskendeznek be 5–10 tagból álló standard referenciavegyületet, amelyek log P-értéke a várt tartomány körül van, és lehetőleg a detektáló rendszerhez kapcsolt regisztráló integrátoron meghatározzák a retenciós időket. Kiszámítják a kapacitástényezők megfelelő – k – logaritmusait, és felrajzolják a lombikrázásos módszerrel meghatározott log P függvényében. A kalibrálást rendszeres időközönként, naponta legalább egyszer elvégzik azért, hogy felismerjék az esetleges változásokat az oszlop viselkedésében.

A vizsgált anyag kapacitási tényezőjének meghatározása

A vizsgált anyagot a mobil fázis lehető legkisebb mennyiségében fecskendezik be. Meghatározzák (kétszer) a retenciós időt, amely lehetővé teszi a k kapacitástényező kiszámítását. A referenciavegyületek korrelációs görbéjéből interpolálható a vizsgált anyag megoszlási hányadosa. Nagyon kicsi és nagyon nagy megoszlási hányadosok esetében extrapoláció szükséges. Ilyen esetekben gondosan kell figyelembe venni a regressziós egyenes konfidenciahatárait.

2. **ADATOK**

Lombikrázásos módszer

A P meghatározott értékeinek megbízhatósága a párhuzamos meghatározások középértékeinek az általános középértékkel való összehasonlításával vizsgálható.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az anyag pontos leírását (azonosság és szennyeződések),

— amikor a módszerek nem alkalmazhatók (például felületaktív anyag), az egyes n-oktanol- és vízoldékonyságon alapuló valamilyen számított értéket vagy becslést kell megadni,

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges valamennyi információt és megjegyzést, különösen azokat, amelyek az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosak.

Lombikrázásos módszer esetében:

— adott esetben az előzetes becslés eredményeit,

— azt a hőmérsékletet, amelyen a meghatározást mérték,

— a koncentrációk meghatározásához használt analitikai eljárások adatait,

— adott esetben a centrifugálás idejét és sebességét,

▼B

— mindkét fázisban a mért koncentrációkat, minden egyes meghatározáshoz (ez azt jelenti, hogy összesen 12 koncentrációnak kell szerepelnie a jelentésben),

— a vizsgált anyag súlyát, az egyes vizsgálati tartályokban alkalmazott minden egyes fázis térfogatát és egyensúlyba hozás után az egyes fázisokban jelen lévő vizsgált anyag teljes, számított mennyiségét,

— a megoszlási hányados (P) számított értékeit, és minden vizsgálati körülmény esetében meg kell adni a középértéket, vagyis minden meghatározáshoz meg kell adni a középértéket. Amennyiben létezik javaslat a megoszlási hányados koncentrációfüggőségére, ezt is szerepeltetni kell a jelentésben,

— meg kell adni az egyes P értékeknek a középérték körüli standard deviációját,

— az összes meghatározásból megállapított átlagos P értéket 10-es alapú logaritmusaként is ki kell kifejezni,

— a számított elméleti P_{ow}-t, amikor ilyen értéket meghatároznak, vagy amikor a mért érték > 10^4,

— a kísérlet során felhasznált víz és vizes fázis pH-ját,

— víz helyett puffer használata esetén a pufferek használatának indoklását, a pufferek összetételét, koncentrációját és pH-ját, és a vizes fázis pH-ját a kísérlet előtt és után.

A HPLC-módszer esetében:

— adott esetben az előzetes becslés eredményét,

— a vizsgált és referenciaanyagokat és azok tisztaságát,

— azt a hőmérséklet-tartományt, amelyben a meghatározások történtek,

— azt a pH-t, amelyben a meghatározások történtek,

— az analitikai és védőoszlop, a mobil fázis és a detektálásra szolgáló eszközök adatait,

— a kalibrálás során használt referenciaanyagok regressziós adatait és a szakirodalomban közölt log P-értékeit,

— az illesztett regressziós egyenes részleteit (log k a log P függvényében),

— a vizsgált vegyület átlagos retenciós adatait és interpolált log P értékét,

— a berendezés és a működési állapot leírását,

— az elúciós profilokat,

— az oszlopba bevitt vizsgált és referenciaanyagok mennyiségét,

— a holtidőt, és mérésének módját.

▼B

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 107. vizsgálati irányelv, a Tanács határozata, C(81) 30 végleges.

(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.) – A Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, Kalifornia, 91711. címről szerezhető be.

(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. Müller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band 1/1, 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., 971, 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

1. Függelék

Számítási/becslési módszerek

BEVEZETÉS

A Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a) című mű ismerteti a számítási módszerek, adatok és példák általános bevezetését.

A P_{ow} számított értékei használhatók:

— annak eldöntésére, hogy a kísérleti módszerek közül melyik megfelelő (lombikrázási tartomány: log P_{ow}: –2-től 4-ig, HPLC-tartomány: log P_{ow}: 0-tól 6-ig),

— a megfelelő vizsgálati körülmények kiválasztásához (például referenciaanyagok HPLC-eljárásokhoz, n-oktanol/víz térfogatarány lombikrázásos módszerhez),

— a lehetséges kísérleti hibák belső laboratóriumi ellenőrzéséhez,

— P_{ow} becslés biztosítására, ahol a kísérleti módszerek technikai okok miatt nem alkalmazhatók.

BECSLÉSI MÓDSZER

A megoszlási hányados előzetes becslése

A megoszlási hányados értéke a tiszta oldószerekben a vizsgálati anyag oldhatóságának segítségével becsülhető meg. Ehhez:

$$P_{\text{telítési}} = \frac{\text{telítésic}_{\text{n – oktanol}}}{\text{telítésic}_{\text{víz}}}$$

SZÁMÍTÁSI MÓDSZEREK

A számítási módszerek alapelve

Minden számítási módszer a molekulának olyan elemekre való formális lebomlásán alapul, amelyekhez ismertek megbízható log P_{ow} értékek. Ekkor a teljes molekula log P_{ow} értékét a megfelelő fragmentum összege plusz az intermolekuláris kölcsönhatásokhoz tartozó korrekciós kifejezések összege adja.

A fragmentumkonstansok és korrekciós kifejezések jegyzékei rendelkezésre állnak (b) (c) (d) (e). Néhányat közülük rendszeresen frissítenek (b).

Minőségi követelmények

Általában a számítási módszer megbízhatósága csökken a vizsgált vegyület növekvő bonyolultságával. Kis molekulasúlyú és egy- vagy kétfunkciós csoportú, egyszerű molekulák esetében a különböző fragmentálási módszerek eredményei és a mért érték között 0,1–0,3 log P_{ow} eltérés várható. Összetettebb molekulák esetében a hibahatár nagyobb lehet. Ez a fragmentumkonstansok megbízhatóságától és rendelkezésre állásától, valamint az intramolekuláris kölcsönhatások (például hidrogénkötések) felismerhetőségétől és a korrekciós kifejezések pontos használatától függ (kisebb a probléma a CLOGP-3-as szoftverrel) (b). Ionizálható vegyületek esetében fontos a töltés vagy az ionizáció mértékének megfelelő figyelembevétele.

▼B

Számítási eljárások

Hansch-féle π-módszer

A Fujita és munkatársai (f) által bevezetett eredeti π hidrofób helyettesítő konstanst a következőképpen definiálták:

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

ahol P_{ow} (PhX) egy aromás származék megoszlási hányadosa és P_{ow} (PhH) a kiindulási vegyület megoszlási hányadosa.

(például $\pi_{Cl} = \log P_{ow} (C_6H_5C1) - \log P_{ow} (C_6H_6) = 2,84 - 2,13 = 0,71$)

A definíció alapján a π-módszer általában aromás szubsztitúcióra alkalmazható. Nagy számú szubstituens π-értékeit (b) (c) (d) már táblázatba foglalták. Ezeket aromás molekulák vagy szubstruktúrák log P_{ow} értékének kiszámításához használják.

A Rekker-féle módszer

Rekker szerint (g) a log P_{ow} érték kiszámítása a következőképpen történik:

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

ahol f_j a különböző molekuláris fragmentumkonstansok és a_i ezeknek a vizsgált molekulában való előfordulási gyakorisága. A korrekciós kifejezések egyetlen C_m konstans (egy úgynevezett „magic constant”) egész számú többszöröseként fejezhetők ki. Az f_j és C_m fragmentumkonstansokat egy 1 054 kísérleti P_{ow} értéket (825 vegyület) tartalmazó jegyzékből határozták meg többszörös regresszióanalízis (c) (h) segítségével. A interakciós kifejezések meghatározását az (e) (h) (i) szakirodalomban leírt szabályoknak megfelelően hajtották végre.

A Hansch–Leo-féle módszer

Hansch és Leo (c) szerint a log P_{ow} érték a következő összefüggésből számítható ki:

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

ahol f_i a különböző molekularész állandói, F_j a korrekciós kifejezések és a_i, b_j a megfelelő előfordulási gyakoriság. Kísérleti P_{ow} értékekből atomos és csoportfragmentálási értékek jegyzékét és F_j korrekciós kifejezések (úgynevezett „tényezők”) jegyzékét határozták meg a fokozatos megközelítés módszerével. A korrekciós kifejezéseket több különböző osztályba sorolták be (a) (c). Viszonylag bonyolult és időigényes minden szabály és korrekciós kifejezés figyelembevétele. Szoftvercsomagokat fejlesztettek ki (b).

Összetett módszer

Összetett molekulák log P_{ow} értékének számítása lényegesen javítható, ha a molekula nagyobb szerkezeti elemekre bontható, amelyekhez rendelkezésre állnak megbízható log P_{ow} értékek táblázatokból (b) (c), vagy saját mérésekből. Az ilyen részek (például heterociklusok, antrakinon, azobenzol) ezután kombinálhatók a Hansch-féle π-értékekkel, vagy a Rekker-vagy Leo-féle részállandókkal.

Megjegyzések

i. A számítási módszerek csak akkor alkalmazhatók részben vagy teljesen ionizált vegyületekhez, amikor lehetőség van a szükséges korrekciós tényező figyelembevételére.

▼B

ii. Amennyiben intramolekuláris hidrogénkötések feltételezhetők, hozzá kell adni a megfelelő korrekciós tagot (körülbelül + 0,6 és + 1,0 közötti log P_{ow} egységek) (a). Az ilyen kötések jelenlétét a molekula sztereomodelljei vagy spektroszkópikus adatai jelezhetik.

iii. Amennyiben több tautomeralak lehetséges, a legvalószínűbb alakot kell használni számítási alapként.

iv. A részkonstansok jegyzékeinek módosítását körültekintően kell végrehajtani.

Vizsgálati jelentés

A számítási/becslési módszerek használatakor a vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az anyag leírását (keverék, szennyeződések stb.),

— minden lehetséges intramolekuláris hidrogénkötés, disszociáció, töltés és minden egyéb szokatlan hatás (például tautoméria) jelzését,

— a számítási módszer leírását,

— az adatbázis azonosítását vagy a készlet ismertetését,

— a részek kiválasztásának sajátosságait,

— a számítás átfogó dokumentálását.

SZAKIRODALOM

(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, Kalifornia 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3)

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

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

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

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

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

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

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

▼B

2. Függelék

HPLC-Módszerhez Javasolt Referenciaanyagok

Szena	Referenciaanyag	log P_{ow}	pKa
1	2-butanon	0,3	
2	4-Acetilpiridin	0,5	
3	Anilin	0,9	
4	Acetanilid	1,0	
5	Benzilalkohol	1,1	
6	p-Metoxifenol	1,3	pKa = 10,26
7	Fenoxiecetsav	1,4	pKa = 3,12
8	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-Dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	Benzonitril	1,6	
11	Fenilacetonitril	1,6	
12	4-Metilbenzil-alkohol	1,6	
13	Acetofenon	1,7	
14	2-Nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	3-Nitrobenzoesav	1,8	pKa = 3,47
16	4-Klóranilin	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobenzol	1,9	
18	Fahéj alkohol	1,9	
19	Benzoesav	1,9	pKa = 4,19
20	p-Krezol	1,9	pKa = 10,17
21	Fahéjsav	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anizol	2,1	
23	Metilbenzoát	2,1	
24	Benzol	2,1	
25	3-Metilbenzoesav	2,4	pKa = 4,27
26	4-Klórfenol	2,4	pKa = 9,1
27	Triklóretilén	2,4	
28	Atrazin	2,6	
29	Etilbenzoát	2,6	
30	2,6-Diklórbenzonitril	2,6	
31	3-Klórbenzoesav	2,7	pKa = 3,82
32	Toluol	2,7	
33	1-Naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-Diklóranilin	2,8	
35	Klórbenzol	2,8	
36	Allil-feniléter	2,9	
37	Brómbenzol	3,0	

▼B

Szena	Referenciaanyag	log P_{ow}	pKa
38	Etilbenzol	3,2	
39	Benzofenon	3,2	
40	4-Fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	Timol	3,3	
42	1,4-Diklórbenzol	3,4	
43	Difenilamin	3,4	pKa = 0,79
44	Naftalin	3,6	
45	Fenilbenzoát	3,6	
46	Izopropilbenzol	3,7	
47	2,4,6-Triklórfenol	3,7	pKa = 6
48	Bifenil	4,0	
49	Benzil-benzoát	4,0	
50	2,4-Dinitro-6-szekunder butilfenol	4,1	
51	1,2,4-Triklórbenzol	4,2	
52	Dedekánsav	4,2	
53	Difeniléter	4,2	
54	n-Butilbenzol	4,5	
55	Fenantrin	4,5	
56	Fluorantén	4,7	
57	Dibenzil	4,8	
58	2,6-Difenilpiridin	4,9	
59	Trifenil-amin	5,7	
60	DDT	6,2	
	Egyéb, alacsony log P_{ow} értékű referenciaanyagok		
1	Nikotinsav	- 0,07	

▼B

A.9. **LOBBANÁSPONT**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag lobbanékonyságáról. A vizsgálati eljárás olyan folyékony anyagokhoz alkalmazható, amelyek gőzeit meggyújthatják gyújtóforrások. A leírásban felsorolt vizsgálati módszerek csak az egyes módszereknél megadott lobbanáspont-tartományoknál megbízhatóak.

A használni kívánt módszer kiválasztásakor vizsgálni kell az anyag és a mintatartó közötti kémiai reakciók lehetőségét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A lobbanáspont az a 101,325 kPa nyomásra korrigált legalacsonyabb hőmérséklet, amelyen a vizsgálati módszerben meghatározott feltételek mellett valamely folyadék olyan mennyiségben fejleszt gőzt, hogy a vizsgálati tartályban meggyújtható gőz/levegő keverék jön létre.

Mértékegységek: ^{o}C

$t = T - 273{,}15$

(t ^{o}C-ban és T K-ben)

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel nyert eredményekkel.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az anyagot vizsgálati tartályban helyezik el, és felmelegítik vagy lehűtik az egyes vizsgálati módszerekben leírt eljárásnak megfelelő vizsgálati hőmérsékletre. Gyújtási kísérleteket végeznek azért, hogy meggyőződjenek arról, fellobban-e vagy sem a minta a vizsgálati hőmérsékleten.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

1.5.1. **Ismételhetőség**

Az ismételhetőség a lobbanáspont-tartománynak és az alkalmazott vizsgálati módszernek megfelelően változik; maximum 2 ^{o}C.

1.5.2. **Érzékenység**

Az érzékenység az alkalmazott vizsgálati módszertől függ.

1.5.3. **Alkalmazhatóság**

Néhány vizsgálati módszer alkalmazhatósága bizonyos lobbanáspont-tartományokra korlátozódik, és az anyaggal kapcsolatos adatoktól (például magas viszkozitás) függ.

▼B

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

A vizsgált anyagból vett mintát valamilyen vizsgáló készülékben helyezik el az 1.6.3.1. és/vagy 1.6.3.2. pontnak megfelelően.

Energiadús vagy toxikus anyagokhoz biztonsági okok miatt ajánlatos kis, körülbelül 2 cm^3 mintaméretet használó módszert alkalmazni.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

A készüléket, amennyiben ez biztonsági szempontból megfelel, huzatmentes helyre kell helyezni.

1.6.3. **A vizsgálat végrehajtása**

1.6.3.1. *Egyensúlyi módszer*

Lásd az ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679-es szabványt.

1.6.3.2. *Nem egyensúlyi módszer*

Ábel-féle készülék:

Lásd a BS 2000 170. részét, az NF M07-011, NF T66-009 szabványt.

Ábel–Pensky-féle készülék:

Lásd az EN 57, DIN 51755 1. részét (5-től 65 °C-ig terjedő hőmérsékletekhez), a DIN 51755 2. részét (5 °C alatti hőmérsékletekhez), az NF M07-036 szabványt.

Tag-féle készülék:

Lásd az ASTM D 56 szabványt.

Pensky-Martens-féle készülék:

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

Megjegyzések:

Amennyiben az 1.6.3.2. pontban szereplő, nem egyensúlyi módszerrel meghatározott lobbanáspontról megállapítják, hogy az értéke 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C vagy 55 ± 2 °C, ezt az eredményt meg kell erősíteni az ugyanezt a készüléket használó valamilyen egyensúlyi módszerrel.

Bejelentéshez csak azok a módszerek használhatók, amelyek megadják a lobbanáspont hőmérsékletét.

Oldószereket tartalmazó, viszkózus folyadékok (festékek, ragasztóanyagok és ehhez hasonlóak) lobbanáspontjának meghatározásához csak viszkózus folyadékok lobbanáspontjának meghatározására alkalmas készülékek és vizsgálati módszerek használhatók.

Lásd az ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 1. részét.

▼B

2. **ADATOK**

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

— meg kell adni az alkalmazott módszert, valamint minden esetleges eltérést,

— az eredményeket és az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

4. **SZAKIRODALOM**

Nincs.

▼B

A.10. TŰZVESZÉLYESSÉG (SZILÁRD ANYAGOK)

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag lehetséges robbanási tulajdonságairól.

Ezt a vizsgálatot csak porszerű, szemcsés vagy pasztaszerű anyagokhoz szabad alkalmazni.

Ahhoz, hogy ne vizsgáljanak minden meggyújtható anyagot, hanem csak azokat, amelyek hevesen égnek, vagy égési tulajdonságai valamilyen ok miatt különösen veszélyesek, csak azok az anyagok tekinthetők tűzveszélyesnek, amelyek égési sebessége meghalad egy bizonyos határértéket.

A tűz eloltásakor jelentkező nehézségek miatt különösen veszélyes lehet, ha a fémporban izzás terjed. A fémporokat tűzveszélyesnek kell tekinteni, ha az anyagban az izzás terjedése egy előírt időtartamon belül van.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Égési idő, másodpercben kifejezve.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincs megadva.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az anyagot megszakítás nélküli, körülbelül 250 mm hosszú csíkba vagy porsávba rendezik, és előzetes vizsgálatot hajtanak végre annak meghatározására, hogy gázlánggal meggyújtva lánggal terjed-e vagy parázslik-e. Amennyiben az előírt időtartamon belül a porcsík 200 mm-es szakasza mentén bekövetkezik a terjedés, teljes vizsgálati programot hajtanak végre az égési sebesség meghatározása érdekében.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincs megadva.

▼B

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előzetes screening vizsgálat**

Az anyagot körülbelül 250 mm hosszú, 20 mm széles és 10 mm magas, megszakítás nélküli csíkba vagy porsávba rendezik egy nem éghető, nem porózus és alacsony hővezető-képességű alaplemezen. Egy (legalább 5 mm átmérőjű) gázégőből forró lángot bocsátanak a porcsík egyik végére mindaddig, amíg a por meg nem gyullad, vagy maximum 2 percig (fémek vagy fémötvözetek porai esetében 5 percig). Figyelni kell, hogy az égés tovaterjed-e a csík 200 mm-es szakasza mentén a 4 perces vizsgálati időtartamon belül (vagy fémporok esetében 40 perc alatt). Amennyiben az anyag nem gyullad meg, és lángolva vagy parázzsal nem továbbítja az égést a porcsík 200 mm-es szakasza mentén a 4 perces (vagy 40 perces) vizsgálati időtartamon belül, akkor az anyagot nem szabad tűzveszélyesnek tekinteni, és további vizsgálat nem szükséges. Amennyiben az anyag kevesebb mint 4 perc alatt vagy fémporok esetében kevesebb mint 40 perc alatt továbbítja az égést a porcsík 200 mm-es szakasza mentén, az alábbiakban (az 1.6.2. pontban és azt követően) leírt eljárást végre kell hajtani.

1.6.2. **Égési sebesség vizsgálata**

1.6.2.1. *Előkészület*

Egy 250 mm hosszú, háromszög keresztmetszetű, 10 mm belső magasságú és 20 mm szélességű formába lazán betöltik a porszerű vagy szemcsés anyagokat. A forma mindkét oldalán, hosszirányban, két fémlemezt helyeznek el oldalsó határoló felületként, amelyek 2 mm-rel túlnyúlnak a háromszög keresztmetszetű alakzat felső szélén (lásd az ábrát). A formát ezután háromszor leejtik 2 cm magasságból valamilyen szilárd felületre. Amennyiben szükséges, a formát újból feltöltik vizsgálati anyaggal. Az oldalhatárolókat ezután eltávolítják, és a felesleges anyagot lekaparják. Valamilyen nem éghető, nem porózus és alacsony hővezető-képességű alaplemezt helyeznek a forma tetejére, a készüléket megfordítják és a formát eltávolítják.

A pasztaszerű anyagokat nem éghető, nem porózus és kis hővezető-képességű alaplemezen terítik el 250 mm hosszúságú és körülbelül 1 cm^2 keresztmetszetű kötél alakjában.

1.6.2.2. *Vizsgálati körülmények*

Nedvszívó anyag esetében a vizsgálatot az anyagnak a tartályból történt eltávolítása után a lehető leggyorsabban kell végrehajtani.

1.6.2.3. *A vizsgálat végrehajtása*

A halmot az elszívószekrény huzatába kell elhelyezni.

A levegősebességnek elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy megakadályozza az égéstermékeknek a laboratóriumba szökését, és ezt nem szabad változtatni a vizsgálat során. Huzaternyőt kell felszerelni a készülék köré.

Gázégőből (legalább 5 mm átmérőjű) kibocsátott forró lángot használnak az anyaghalom egyik végén történő meggyújtására. Amikor a halom már 80 mm távolságig égett, megmérik az égési sebességet a következő 100 mm mentén.

▼B

A vizsgálatot hatszor hajtják végre, minden alkalommal tiszta, hideg lemezt használva, kivéve ha korábban pozitív eredményt kaptak.

2. **ADATOK**

Az értékeléshez az előzetes szűrővizsgálat (1.6.1.) során nyert égési idő és a legfeljebb hat vizsgálatban (1.6.2.3.) nyert legrövidebb égési idő kell.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

— a vizsgált anyag leírását, ennek fizikai állapotát, beleértve a nedvességtartalmat,

— az előzetes screening-vizsgálat és az égési sebesség vizsgálata során nyert eredményeket, amennyiben végeztek ilyen vizsgálatokat,

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

3.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A porszerű, szemcsés vagy pasztaszerű anyagokat tűzveszélyesnek kell tekinteni, amennyiben az 1.6.2. pontban leírt vizsgálati eljárásnak megfelelően végrehajtott bármely vizsgálat során az égési idő kevesebb mint 45 másodperc. Fémek vagy fémötvözetek porait tűzveszélyesnek kell tekinteni, amennyiben meggyújthatók, és a láng vagy a reakciózóna 10 perc vagy ennél rövidebb idő alatt halad keresztül a teljes mintán.

4. **FELHASZNÁLT IRODALOM**

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

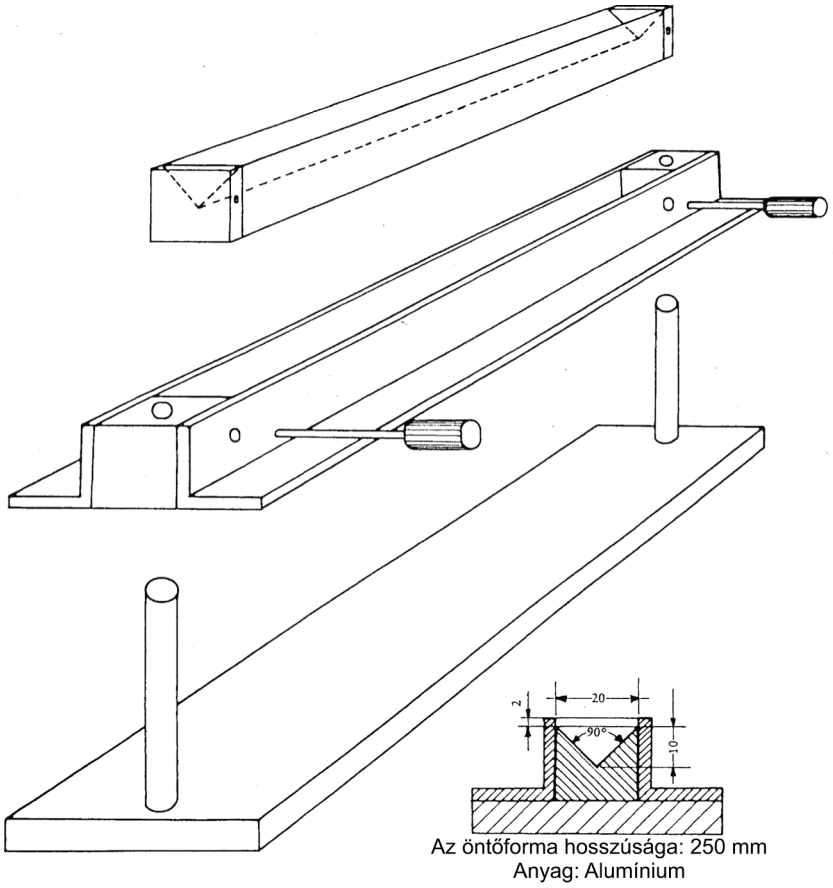
▼B

Függelék

Ábra

Forma és tartozékok a halom elkészítéséhez

(Minden métet mm-ben van megadva)



Az öntőforma hosszúsága: 250 mm
Anyag: Alumínium

▼B

A.11. TŰZVESZÉLYESSÉG (GÁZOK)

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

A módszer lehetővé teszi annak meghatározását, hogy levegővel kevert, szobahőmérsékletű (körülbelül 20 °C-os) és légköri nyomású gázok tűzveszélyesek-e, és ha igen, milyen koncentrációtartományban. A vizsgálati gáz levegővel alkotott, egyre növekvő gázkoncentrációjú keverékeit elektromos szikra hatásának teszik ki, és figyelik, hogy előfordul-e gyulladás.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A tűzveszélyességi tartomány az alsó és felső robbanási határ közötti koncentrációtartomány. Az alsó és felső robbanási határ a levegővel kevert, kismértékben tűzveszélyes gáznak azon koncentrációhatárai, amelyeknél nem jön létre lángterjedés.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincs megadva.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Lépésenként növelik a gázkoncentrációt a levegőben, és a keveréket minden egyes szakaszban elektromos szikra hatásának teszik ki.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincs megadva.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Készülék**

A vizsgálati tartály egy függőleges, 50 mm minimális belső átmérőjű és 300 mm minimális magasságú üveghenger. A gyújtóelektródák 3–5 mm távolságra vannak egymástól, és a henger aljától 60 mm-re helyezkednek el. A hengert nyomásmentesítő nyílással szerelték fel. A készüléket védőburkolattal kell ellátni mindenféle robbanásveszély korlátozására.

Gyújtóforrásként 0,5 szekundum időtartamú, álló, indukciós szikrát használnak, amelyet 10– 15 kV kimeneti feszültségű (bemeneti teljesítmény maximum 300 W), nagyfeszültségű transzformátor hoz létre. A (2) szakirodalom az alkalmas készülék egy példáját írja le.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

A vizsgálatot szobahőmérsékleten (körülbelül 20 °C) kell végrehajtani.

▼B

1.6.3. **A vizsgálat végrehajtása**

Adagoló szivattyúk segítségével ismert koncentrációjú, levegőbe kevert gázt visznek be az üveghengerbe. Szikrát vezetnek a keveréken keresztül, és megfigyelik, hogy elválik-e a láng a gyújtóforrástól és terjed-e önállóan. A gázkoncentrációt 1 térfogatszázalékos lépésekben változtatják, amíg be nem következik a gyulladás a fentieknek megfelelően.

Amennyiben a gáz kémiai szerkezete azt jelzi, hogy az valószínűleg nem tűzveszélyes, és kiszámítható a levegővel alkotott sztöchiometrikus keveréke, akkor csak a sztöchiometriai összetételnél 10 %-kal kisebb értékűtől a 10 %-kal nagyobb összetételig terjedő tartományban lévő keverékeket kell megvizsgálni 1 %-os lépésekben.

2. **ADATOK**

E tulajdonság meghatározásához a lángterjedés előfordulása az egyetlen lényeges információ.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

— a vizsgálathoz használt készülék leírását, a méreteivel együtt,

— azt a hőmérsékletet, amelyen a vizsgálatot végrehajtották,

— a vizsgált koncentrációkat és a kapott eredményeket,

— a vizsgálat eredményét: nem tűzveszélyes gáz vagy tűzveszélyes gáz,

— amennyiben arra a következtetésre jutottak, hogy a gáz nem tűzveszélyes, meg kell adni azt a koncentrációtartományt, amely felett 1 %-os lépésekben vizsgálták meg,

— az eredmények értelmezéséhez szükséges minden információt és megjegyzést közölni kell.

4. **SZAKIRODALOM**

(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. Crosse-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. TŰZVESZÉLYESSÉG (ÉRINTKEZÉS VÍZZEL)

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálati módszer annak meghatározására használható, hogy valamely anyag vízzel vagy nedves levegővel létrejött reakciója olyan gáz vagy gázok fejlődéséhez vezet-e, amelyek tűzveszélyesek.

A vizsgálati módszer mind szilárd, mind folyékony anyagokhoz alkalmazható. E módszer nem alkalmazható olyan anyagoknál, amelyeknél öngyulladás lép fel, amikor levegővel érintkeznek.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Tűzveszélyesek: azok az anyagok, amelyek vízzel vagy nedves levegővel érintkezve veszélyes mennyiségben, minimum 1 liter/kg/óra ütemben fejlesztenek tűzveszélyes gázokat.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az anyagot az alábbi lépések sorrendjének megfelelően vizsgálják; amennyiben valamely lépésnél gyulladás következik be, további vizsgálat nem szükséges. Amennyiben ismert, hogy az anyag nem lép erőteljes reakcióba vízzel, tovább kell haladni a 4. lépéshez (1.3.4.).

1.3.1. **1. lépés**

A vizsgált anyagot elhelyezik egy 20 °C-os hőmérsékletű desztillált vizet tartalmazó tálba, és figyelik, hogy a fejlődő gáz meggyullad-e.

1.3.2. **2. lépés**

A vizsgált anyagot egy 20 °C-os hőmérsékletű desztillált vizet tartalmazó edény felületén lebegő szűrőpapírra helyezik, és figyelik, hogy a fejlődő gáz meggyullad-e. A szűrőpapír arra szolgál, hogy egy helyen tartsa az anyagot a gyulladás lehetőségének növelésére.

1.3.3. **3. lépés**

A vizsgált anyagot egy körülbelül 2 cm magas és 3 cm átmérőjű halomba helyezik. Néhány csepp vizet adnak hozzá a halomhoz, és figyelik, hogy a fejlődő gáz meggyullad-e.

1.3.4. **4. lépés**

A vizsgált anyagot 20 °C-os hőmérsékletű desztillált vízzel keverik, és a gázfejlődés sebességét 7 órán keresztül mérik, 1 órás időközönként. Amennyiben a gázfejlődés sebessége egyenetlen vagy növekszik, 7 óra után a mérési időt meg kell növelni maximum 5 napra. A vizsgálat megállítható, ha a sebesség bármikor az 1 liter/kg/órát meghaladja.

▼B

1.4. REFERENCIAANYAGOK

Nincs megadva.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincs megadva.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZEREK LEÍRÁSA

1.6.1. **1. lépés**

1.6.1.1. *Vizsgálati körülmények*

A vizsgálatot szobahőmérsékleten (körülbelül 20 °C-on) hajtják végre.

1.6.1.2. *A vizsgálat végrehajtása*

Desztillált vizet tartalmazó tálba kismennyiségű (körülbelül 2 mm átmérőjű) vizsgált anyagot kell helyezni. Figyelni kell, hogy i) fejlődik-e gáz; és hogy ii) meggyullad-e a gáz. Amennyiben a gáz meggyullad, nincs szükség az anyag további vizsgálatára, mivel az anyagot veszélyesnek kell tekinteni.

1.6.2. **2. lépés**

1.6.2.1. *Készülék*

Valamilyen alkalmas tartályban, például egy 100 mm átmérőjű lepárlóedényben lévő desztillált víz felszínén szűrőpapírt lebegtetnek.

1.6.2.2. *Vizsgálati körülmények*

A vizsgálatot szobahőmérsékleten (körülbelül 20 °C-on) hajtják végre.

1.6.2.3. *A vizsgálat végrehajtása*

A szűrőpapír közepére kismennyiségű (körülbelül 2 mm átmérőjű) vizsgált anyagot helyeznek. Figyelni kell, hogy i. fejlődik-e gáz; és hogy ii. meggyullad-e. Amennyiben a gáz meggyullad, nincs szükség az anyag további vizsgálatára, mivel az anyagot veszélyesnek kell tekinteni.

1.6.3. **3. lépés**

1.6.3.1. *Vizsgálati körülmények*

A vizsgálatot szobahőmérsékleten (körülbelül 20 °C-on) hajtják végre.

1.6.3.2. *A vizsgálat végrehajtása*

A vizsgált anyagot körülbelül 2 cm magasságú és 3 cm átmérőjű, a tetején mélyedéssel ellátott halomba helyezik. Néhány csepp vizet adnak a bemélyedt részhez, és figyelik, hogy i. fejlődik-e gáz; és hogy ii. meggyullad-e. Amennyiben a gáz meggyullad, az anyag további vizsgálatára nincs szükség, mivel az anyagot veszélyesnek kell tekinteni.

▼B

1.6.4. **4. lépés**

1.6.4.1. *Készülék*

A készülék felépítését az ábra mutatja.

1.6.4.2. *Vizsgálati körülmények*

Vizsgálni kell a vizsgált anyagot tartalmazó tartályt, hogy van-e benne 500 μm-nél kisebb (részecskeméretű) por. Amennyiben a por a teljes anyag több mint 1 tömegszázaléka, vagy ha a minta morzsálódik, akkor a teljes anyagot porrá kell őrölni vizsgálat előtt a tárolás és kezelés alatti részecskeméret csökkenésének figyelembevétele érdekében; egyébként az anyagot olyan állapotban kell megvizsgálni, ahogyan átvették. A vizsgálatot szobahőmérsékleten (körülbelül 20 ^{o}C-on) és légköri nyomáson kell végrehajtani.

1.6.4.3. *A vizsgálat végrehajtása*

10–20 ml vizet öntenek a készülék csepegtetőtölcsérébe, és 10 gramm anyagot helyeznek a kúp alakú lombikba. A fejlődő gáz térfogata bármilyen, erre alkalmas eszközzel mérhető. Kinyitják a csepegtetőtölcsér elzárócsapját, hogy beengedjék a vizet a kúp alakú lombikba, és elindítanak egy stopperórát. A gázfejlődést óránként mérik a 7 órás időtartam során. Amennyiben ez alatt az időtartam alatt a gázfejlődés egyenetlen, vagy ha az időtartam végén növekszik a gázfejlődés sebessége, a méréseket folytatni kell, legfeljebb öt napig. Amennyiben a mérés során bármikor a gázfejlődés sebessége meghaladja az 1 liter/kg/órát, a vizsgálat megszakítható. Ezt a vizsgálatot háromszor kell elvégezni.

Amennyiben ismeretlen a gáz kémiai összetétele, elemezni kell a gázt. Amennyiben a gáz tűzveszélyes komponenseket tartalmaz, és nem ismert, hogy a teljes keverék tűzveszélyes-e, vagy sem, ugyanolyan összetételű keveréket kell készíteni, és megvizsgálni az A. 11. módszernek megfelelően.

2. **ADATOK**

Az anyagot veszélyesnek kell tekinteni, ha:

— öngyulladás jön létre a vizsgálati eljárás bármelyik lépésében,

vagy

— 1 liter/kg anyag/óránál nagyobb sebességgel fejlődik kismértékben tűzveszélyes gáz.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

— a vizsgált anyag minden előkészítésének részleteit,

▼B

— a vizsgálatok eredményeit (1., 2., 3. és 4. lépés),

— a fejlődő gáz kémiai összetételét,

— a gázfejlődés sebességét, ha a 4. lépést (1.6.4.) végrehajtják,

— az eredmények értelmezéséhez lényeges minden további megjegyzést.

4. **SZAKIRODALOM**

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

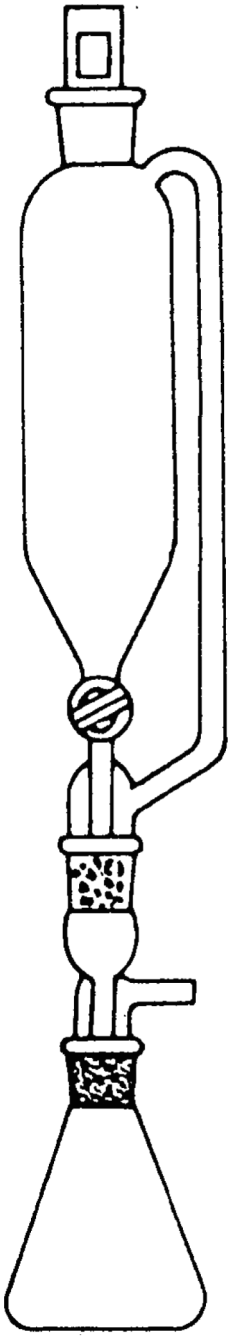
(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Függelék

Ábra

Készülék



▼B

A.13. SZILÁRD ANYAGOK ÉS FOLYADÉKOK ÖNGYULLADÁSI KÉPESSÉGE

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

A vizsgálati eljárás olyan szilárd vagy folyékony anyagoknál alkalmazható, amelyek kis mennyiségekben öngyulladással meggyulladnak rövid idővel azután, hogy érintkezésbe lépnek a szobahőmérsékletű (körülbelül 20 °C-os) levegővel.

Azokra az anyagokra, amelyeket a gyulladás bekövetkezése előtt órákon vagy napokon át szobahőmérséklet vagy magas hőmérséklet hatásának kell kitenni, e vizsgálati módszer nem vonatkozik.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Azok az anyagok tekinthetők pirofórosnak, amelyek meggyulladnak, vagy az 1.6. pontban leírt feltételek mellett szenesedést okoznak.

Folyadékoknál lehet, hogy az öngyulladást is meg kell vizsgálni az öngyulladási hőmérséklet (folyadékok és gázok) című A.15. módszer segítségével.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincs megadva.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A szilárd vagy folyékony anyagot hozzáadják egy inert hordozóanyaghoz, és környezeti hőmérsékleten érintkezésbe hozzák a levegővel 5 perces időtartamig. Amennyiben a folyékony anyagok nem gyulladnak meg ilyen körülmények között, azokat szűrőpapírral felitatják, és környezeti hőmérsékleten (körülbelül 20 °C-on) levegő hatásának teszik ki 5 percre. Amennyiben a szilárd vagy folyékony anyag meggyullad, vagy a folyékony anyag meggyújtja vagy elszenesíti a szűrőpapírt, akkor az anyagot pirofórosnak tekintik.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Ismételhetőség: a biztonsággal kapcsolatos jelentősége miatt egyetlen pozitív eredmény elegendő ahhoz, hogy az anyagot pirofórosnak tekintsék.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Készülék**

Egy körülbelül 10 cm átmérőjű porceláncsészét szobahőmérsékleten (körülbelül 20 °C-on) megtöltenek kovafölddel körülbelül 5 mm magasságig.

Megjegyzés:

A kovaföldet vagy bármilyen más, ehhez hasonló inert anyagot, amely könnyen beszerezhető, úgy kell kiválasztani, hogy olyan talajra legyen reprezentatív, amelyre a vizsgált anyag baleset esetén kifolyhat.

Száraz szűrőpapír szükséges olyan folyadékok vizsgálatához, amelyek levegővel érintkezve nem gyulladnak meg inert hordozóanyaggal történő érintkezéskor.

▼B

1.6.2. **A vizsgálat végrehajtása**

a) *Porszerű szilárd anyagok*

A vizsgálandó porszerű anyagból 1–2 cm^3-t kiöntenek körülbelül 1 méter magasságról egy nem éghető felületre, és figyelik, hogy meggyullad-e az anyag a leejtés során vagy az öntéstől számított 5 percen belül.

A vizsgálatot hat alkalommal hajtják végre, kivéve ha meggyullad az anyag.

b) *Folyadékok*

Körülbelül 5 cm^3 vizsgált folyadékot öntenek az előkészített porceláncsészébe, és figyelik, hogy 5 percen belül meggyullad-e az anyag.

Amennyiben nem gyullad meg a hatszor elvégzett vizsgálat során, a következő vizsgálatokat hajtják végre:

Fecskendőből 0,5 ml vizsgált anyagot helyeznek egy bevagdosott szűrőpapírra, és figyelik, hogy megyullad-e, illetve elszenesedik-e a szűrőpapír a folyadék hozzáadásától számított 5 percen belül. A vizsgálatot háromszor hajtják végre, kivéve ha meggyullad vagy elszenesedik a szűrőpapír.

2. **ADATOK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

A vizsgálat abbahagyható, amennyiben valamelyik vizsgálat eredménye pozitív.

2.2. ÉRTÉKELÉS

Amennyiben valamely inert hordozóanyaghoz való hozzáadás és levegő hatásának való expozíció után az anyag 5 percen belül meggyullad, vagy valamely folyékony anyag a levegő hatásának való expozíció után 5 percen belül elszenesít vagy meggyújt egy szűrőpapírt, az anyagot pirofórosnak tekintik.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

— a vizsgálatok eredményeit,

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

4. **SZAKIRODALOM**

(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. **ROBBANÁSI TULAJDONSÁGOK**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

A módszer egy vizsgálatvázlatot ismertet annak meghatározására, hogy robbanásveszélyes-e valamely szilárd vagy pépes anyag, amikor láng (hőérzékenység), illetve ütés vagy súrlódás (mechanikai hatással szembeni érzékenység) hatásának van kitéve, és hogy robbanásveszélyes-e valamely folyékony anyag, amikor láng vagy ütés hatásának van kitéve.

A módszer három részből áll:

a) hőérzékenység vizsgálata (1);

b) ütéssel kapcsolatos mechanikai hatással szembeni érzékenység vizsgálata (1);

c) súrlódással kapcsolatos mechanikai hatással szembeni érzékenység vizsgálata (1).

A módszer bizonyos általános határ segítségével adatokat ad meg a robbanás bekövetkezése valószínűségének meghatározására. A módszert nem annak megállapítására tervezték, hogy bizonyos körülmények között képes-e az anyag robbanásra.

A módszer alkalmas annak meghatározására, hogy az anyag robbanásveszélyes-e (hő- és mechanikai hatással szembeni érzékenység) az irányelvben előírt különleges körülmények között. A módszer alapja számos, nemzetközileg széles körben használt készüléktípus (1), amelyek rendszerint kielégítő eredményeket adnak. Ismert, hogy a módszer nem ad végleges eredményt. A megadott készülék helyett használható más készülék, feltéve hogy az nemzetközileg elismert, és hogy az eredmények összeegyeztethetők a megadott készülékkel kapott eredményekkel.

A vizsgálatokat nem kell végrehajtani, amikor a rendelkezésre álló termodinamikai információk (például képződéshő, bomláshő) és/vagy a szerkezeti képletben egyes reakcióképes csoportok hiánya (2) vitathatatlanul bizonyossá teszi, hogy az anyag nem képes gázképződéssel vagy hőfelszabadulással járó gyors bomlásra (vagyis az anyag nem jelent semmilyen robbanásveszélyt). Folyadékoknál nincs szükség súrlódással kapcsolatos mechanikai hatással szembeni érzékenységvizsgálatra.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Robbanásveszélyes:

Azok az anyagok, amelyek láng hatására robbanhatnak, vagy amelyek a megadott készülékben az ütésre vagy rázásra érzékenyek (vagy mechanikai hatással szemben érzékenyebbek, mint az 1,3-dinitro-benzol az alternatív készülékben).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

1,3-dinitro-benzol, 0,5 mm-es szitán átszitált, rostált, kristályos technikai termék, a súrlódást és ütést vizsgáló módszerekhez.

Vizes ciklohexánonból átkristályosított, nedvesen szitált, 250 μm nyíláson átmenő és 150 μm nyílásméretű szitán visszamaradó, 103 ± 2 °C hőmérsékleten (4 órán át) szárított Perhidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX, hexogén, ciklonit – CAS 121-82-4) a második súrlódás- és ütésvizsgálat-sorozathoz.

▼B

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Előzetes vizsgálatok szükségesek a három érzékenységvizsgálat végrehajtása érdekében a biztonságos körülmények létrehozásához.

1.4.1. **Biztonság a kezelés során – vizsgálatok (3)**

Biztonsági okok miatt a fő vizsgálatok végrehajtása előtt kismennyiségű (körülbelül 10 mg) anyagmintát – anélkül, hogy gázlángba beleérne – hevítenek, alkalmas formájú készülékben ütéssel, és egy üllőn fakalapács használatával vagy súrlódást létrehozó géppel súrlódás hatásának teszik ki. E vizsgálat célja meggyőződni arról, hogy érzékeny-e és robbanásveszélyes-e annyira az anyag, hogy az előírt érzékenységi vizsgálatokat, különösen a hőhatással szembeni érzékenységvizsgálatot, különleges óvintézkedések mellett kell-e végrehajtani a vizsgálatot végző személy sérülésének elkerülésére.

1.4.2. **Hőérzékenység**

A módszer magában foglalja az anyagnak a különböző nyílásátmérőjű mérőperemek által lezárt acélcsőben történő melegítését annak meghatározására, hogy hajlamos-e robbanásra az anyag erős hevítés és meghatározott mértékű fojtás mellett.

1.4.3. **Mechanikai hatással szembeni érzékenység (ütés)**

A módszer magában foglalja az anyag expozícióját olyan ütés hatásának, amelyet egy megadott magasságról leejtett, megadott tömeg hoz létre.

1.4.4. **Mechanikai hatással szembeni érzékenység (súrlódás)**

A módszer magában foglalja a szilárd vagy pépes anyagok expozícióját súrlódás hatásának, szabványosított felületek között, előírt terheléssel és relatív elmozdulással.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincs megadva.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Hőérzékenység (láng hatása)**

1.6.1.1. *Készülék*

A készülék egy fűtő- és védőkészülékbe szerelt, újra fel nem használható acélcsőből, valamint annak újrahasználható zárószerkezetéből áll (1. ábra). Valamennyi cső acéllemezből, mélyhúzással készült (lásd a függeléket), 24 mm belső átmérőjű, 75 mm hosszúságú és 0,5 mm falvastagságú. A csövek a nyitott végükön peremmel vannak ellátva azért, hogy lezárhatók legyenek a zárólemez-szerkezettel. Ez egy központi furattal rendelkező, a csőhöz kétrészes csatlakozással (anya és menetes gyűrű) szorosan rögzített, nyomásálló zárólemezből áll. Az anya és a menetes gyűrű króm-mangán acélból készült (lásd a függeléket), amely egészen 800 °C hőmérsékletig szikramentes. A zárólemezek 6 mm vastagságú, hőálló acélból készültek (lásd a függeléket), és különböző nyílásátmérővel rendelkeznek.

▼B

1.6.1.2. *Vizsgálati körülmények*

Az anyagot az átvételkor rendszerint megvizsgálják, bizonyos esetekben, például préselt, öntött, vagy más módon tömörített anyagok esetében, szükség lehet az anyag aprítás utáni vizsgálatára.

Szilárd anyagok esetében az egyes vizsgálatok során használandó anyag mennyiségét kétszakaszos száraz futtatási eljárás segítségével határozzák meg. Egy kitáralt csövet, amelynek előzőleg megmérték az önsúlyát, megtöltenek 9 cm^3 anyaggal, és az anyagot tömörítik a cső teljes keresztmetszetére ható 80 N erővel. Biztonsági okokból vagy olyan esetekben, ahol összenyomással változtatható a minta fizikai alakja, más töltési eljárások is használhatók; például ha az anyag nagyon érzékeny a súrlódásra, a tömörítés nem megfelelő. Amennyiben az anyag összenyomható, addig folytatják a további anyagbevitelt és tömörítést, amíg a cső felső vége alatt 55 mm-re van feltöltve. Meghatározzák a cső 55 mm-es szintjéig a feltöltéshez használt össztömeget, és hozzáadnak két további adagot, mindkettőt 80 N erővel tömörítve. Ezután szükség szerint, tömörítéssel hozzáadnak vagy kivesznek anyagot úgy, hogy a töltési szint a cső felső végétől 15 mm-re legyen. A második száraz futtatást, az első száraz futtatásban megállapított teljes tömeg egyharmadának tömörített mennyiségével kezdik el. Hozzáadnak két további ilyen adagot 80 N tömörítéssel, és a csőben az anyagszintet a cső felső végétől 15 mm-re állítják be, szükség szerint anyag hozzáadásával vagy elvételével. A második száraz futtatásban meghatározott anyagmennyiséget használják minden egyes vizsgálathoz; a megtöltést három egyenlő mennyiségben hajtják végre, mindegyiket 9 cm^3-re sűrítik össze olyan erővel, amely ehhez szükséges. (Ez megkönnyíthető menetes gyűrűk segítségével.)

Folyadékokat és géleket 60 mm-es magasságig töltenek be a csőbe, a gélek esetében különös gondossággal kell eljárni annak megakadályozása érdekében, hogy üregek alakuljanak ki. A menetes gyűrűt alulról a csőre csúsztatják, behelyezik a megfelelő zárólemezt, és meghúzzák az anyát valamennyi molibdén-diszulfid bázisú kenőanyag felvitele után. Lényeges annak ellenőrzése, hogy nem került anyag a karima és a lemez közé vagy a menetekbe.

A hevítést nyomásszabályozóval (60–70 mbar) felszerelt ipari palackból egy áramlásmérőn átvezetett és a négy égőhöz elosztócsövön keresztül egyenletesen elosztott (amelyet az égőkből a lángok vizuális megfigyelése jelez) propán biztosítja. Az égőket az 1. ábrának megfelelően a vizsgálati kamra köré helyezték el. A négy gázégő együttes fogyasztása körülbelül 3,2 liter propán/perc. Használhatók más éghető gázok és égők, de a hevítési sebességnek a 3. ábrán megadottnak kell lennie. Minden készülék esetében a hevítési sebességet rendszeres időközönként ellenőrizni kell dibutil-ftaláttal megtöltött csövek segítségével a 3. ábrának megfelelően.

1.6.1.3. *A vizsgálatok végrehajtása*

Minden egyes vizsgálatot addig kell végezni, amíg a cső szét nem esik, vagy már 5 percig nem hevítették. Amennyiben a cső három vagy több darabra törik szét, amelyek néhány esetben a 2. ábrának megfelelően keskeny fémcsíkokkal összekapcsolhatók, ezt úgy értékelik, hogy robbanás történt. Az olyan vizsgálatokat, amelyeknél kevesebb töredék jön létre, vagy egyáltalán nem törik szét a cső, úgy tekintik, hogy nem eredményeznek robbanást.

▼B

Először egy három vizsgálatból álló vizsgálatsorozatot hajtanak végre 6,0 mm átmérőjű zárólemezzel, és ha nem történik robbanás, egy második, három vizsgálatból álló vizsgálatsorozat hajtanak végre 2,0 mm átmérőjű mérőperemmel. Amennyiben a két vizsgálatsorozat végrehajtása során valamelyiknél robbanás történik, nincs szükség további vizsgálatokra.

1.6.1.4. *Kiértékelés*

A vizsgálat eredményét pozitívnak tekintik, ha a fenti vizsgálatsorozatok valamelyikében robbanás történt.

1.6.2. **Mechanikai hatással szembeni érzékenység (ütés)**

1.6.2.1. *Készülék (4. ábra)*

Egy jellegzetes ejtőkalapácsos készülék lényeges részei egy alaplappal ellátott öntöttacél tömb, üllő, oszlop, vezetők, ejtősúlyok, kioldó készülék és egy mintatartó. A 100 mm (átmérőjű) × 70 mm (magasságú) acélüllőt a 450 mm (hosszúságú) × 450 mm (szélességű) × 60 mm (magasságú) öntött alaplappal ellátott, 230 mm (hosszúságú) × 250 mm (szélességű) × 200 mm (magasságú) acéltömb tetejéhez csavarozzák. Egy varratmentes húzott acélcsőből készült oszlopot rögzítettek az acéltömb hátsó részéhez csavarozott tartóba. Négy csavar rögzíti a készüléket egy tömör, 60 × 60 × 60 cm-es betontömbhöz úgy, hogy a vezető sínek tökéletesen függőlegesek, és az ejtősúly szabadon esik. A vizsgálathoz 5 és 10 kg-os, tömör acélból készült súlyokat alkalmaznak. Minden egyes súly ütőfeje HRC 60–63 keménységű és 25 mm-es minimális átmérőjű edzett acél.

A vizsgált mintát két koaxiális, egymás fölött elhelyezett, tömör acélhengerből álló ütőkészülékbe zárják egy hengeres acél vezetőgyűrű bemélyedésében. A tömör acélhengerek 10 (- 0,003, - 0,005) mm átmérőjűek és 10 mm magasságúak, és felületük csiszolt, szélük lekerekített (0,5 mm-es görbületi sugár), és HRC 58–65 keménységűek. A hengermélyedés külső átmérője 16 mm, magassága 13 mm, és egy 10 (+ 0,005, + 0,010) mm-es csiszolt furattal kell rendelkeznie. Az ütőkészüléket acélból készült (26 mm átmérőjű és 26 mm magasságú), közbeeső üllőre szerelték, és egy, a füstgázok távozását lehetővé tevő, perforált gyűrűvel állítják középpontba.

1.6.2.2. *Vizsgálati körülmények*

A minta térfogata 40 mm^3 vagy valamilyen alternatív készülékhez megfelelő térfogatú legyen. A szilárd anyagokat száraz állapotban kell vizsgálni, és a következőképpen kell előkészíteni:

a) a por alakú anyagokat szitálják (0,5 mm-es szitaméret); a szitán átjutó anyagot használják a vizsgálathoz;

b) a préselt, öntött vagy más módon tömörített anyagokat kis darabokra törik és szitálják; a 0,5 és 1 mm közötti átmérőjű szitált frakciót használják a vizsgálathoz, a szitált frakciónak az eredeti anyagra reprezentatívnak kell lennie.

Az általában pép formájában szállított anyagokat, amennyiben lehetséges, száraz állapotban, vagy minden esetben a lehető legnagyobb mennyiségű oldószer eltávolítását követően kell vizsgálni. A folyékony anyagokat a felső és alsó acélhengerek között 1 mm-es réssel vizsgálják.

▼B

1.6.2.3. *A vizsgálatok végrehajtása*

Hat vizsgálatból álló vizsgálatsorozatot hajtanak végre, a 10 kg-os tömeget 0,40 méterről (40 J) ejtik le. Amennyiben robbanás következik be a 40 J-lal végrehajtott hat vizsgálat valamelyike során, további hat vizsgálatból álló vizsgálatsorozatot kell végrehajtani, ahol 5 kg-os tömeget kell leejteni 0,15 méterről (7,5 J). Más készülékekben a mintát összehasonlítják a kiválasztott referenciaanyaggal egy meghatározott eljárás (például fel-le módszer stb.) segítségével.

1.6.2.4. *Értékelés*

A vizsgálat eredményét pozitívnak tekintik, ha az előírt ütőkészülékkel végrehajtott vizsgálatok bármelyikében legalább egyszer robbanás következik be (ezzel egyenértékű a lángba borulás és/vagy durranás), vagy a minta érzékenyebbnek bizonyul, mint az 1,3-dinitro-benzol vagy az RDX valamelyik alternatív ütésvizsgálatban.

1.6.3. **Mechanikai hatással szembeni érzékenység (súrlódás)**

1.6.3.1. *Készülék (5. ábra)*

A súrlódásérzékenységet vizsgáló berendezés egy öntöttacél alaplemezből áll, amelyre a súrlódási érzékenységet vizsgáló készüléket felszerelték. Ez a készülék egy rögzített porcelánhengerből és egy mozgó porcelánlapból áll. A porcelánlapot egy kocsin tartják, amely két csúszópályán fut. A kocsit hajtórúd, hüvelyvonó karom és alkalmas hajtómű csatlakoztatja a villamos motorhoz úgy, hogy a porcelánlap csak egyszer mozdul előre és hátra 10 mm-t a porcelánhenger alatt. A porcelánhenger terhelhető, például 120 vagy 360 newtonnal.

A porcelánlapok fehér ipari porcelánból (9–32 μm érdesség) készültek, és 25 mm (hosszúság) × 25 mm (szélesség) × 5 mm (magasság) méretűek. A porcelánhenger ugyancsak fehér ipari porcelánból készült, és ez 15 mm hosszú, 10 mm átmérőjű és 10 mm görbületi sugarú, érdesített gömbszeletekkel rendelkezik.

1.6.3.2. *Vizsgálati körülmények*

A minta térfogata 10 mm^3 vagy az adott alternatív berendezésnek megfelelő térfogatú legyen.

A szilárd anyagokat száraz állapotban vizsgálják, és a következőképpen készítik elő:

a) a por alakú anyagokat szitálják (0,5 mm-es szitaméret); a szitán átjutó anyagot használják a vizsgálathoz;

b) a préselt, öntött vagy más módon tömörített anyagokat darabokra törik és szitálják; a < 0,5 mm átmérőjű szitált frakciót használják vizsgálathoz.

Az általában pép formában szállított anyagokat, amennyiben lehetséges, száraz állapotban kell megvizsgálni. Amennyiben az anyag száraz állapotban nem készíthető el, a pépet (a lehető legnagyobb oldószermennyiség eltávolítása után) egy formával készített, 0,5 mm vastag, 2 mm széles, 10 mm hosszú filmként vizsgálják.

▼B

1.6.3.3. *A vizsgálatok végrehajtása*

A porcelánhengert a vizsgált mintára helyezik, és ráadják a terhelést. A vizsgálat végrehajtásakor a porcelánlap porozitási jelzésének harántirányban kell állnia a mozgás irányával. Ügyelni kell arra, hogy amikor a hengert a mintára helyezik, elegendő vizsgált anyag legyen a henger alatt, és a lap megfelelően mozogjon a henger alatt. Pépes anyagokhoz egy 2 × 10 mm-es nyílású, 0,5 mm vastag mérőeszközt használnak az anyag lapra történő felvitelére. A porcelánlapnak 10 mm-t kell előre és visszafelé mozognia a porcelánhenger alatt 0,44 másodpercen belül. A lap és henger felületének minden részét csak egyszer szabad használni; a henger két vége két vizsgálathoz, a lap két felülete felületenként három vizsgálathoz használható.

Hat vizsgálatból álló vizsgálatsorozatot hajtanak végre 360 N terheléssel. Amennyiben pozitív eredményt kapnak ez alatt a hat vizsgálat alatt, további hat vizsgálatból álló vizsgálatsorozatot kell végrehajtani 120 N terheléssel. Egy másik készülékben a mintát összehasonlítják a kiválasztott referenciaanyaggal egy erre meghatározott eljárás (például fel-le módszer) segítségével.

1.6.3.4. *Értékelés*

A vizsgálati eredmény akkor tekinthető pozitívnak, ha az előírt súrlódási érzékenységet vizsgáló berendezéssel végrehajtott vizsgálatok valamelyikében legalább egyszer robbanás jön létre (a robbanással egyenértékű a sercegés és/vagy a csattanás vagy lángba borulás), vagy egy alternatív súrlódásvizsgálat során teljesül az ezzel egyenértékű követelmény.

2. **ADATOK**

Elvben az anyagot az irányelv értelmében robbanásveszélyesnek kell tekinteni, ha a hő, ütés vagy súrlódási érzékenység vizsgálata során pozitív eredményt kapnak.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— a vizsgált anyag azonosítását, összetételét, tisztaságát, nedvességtartalmát stb.,

— a minta fizikai jellemzőit, és annak feltüntetését, hogy őrölték, aprították és/vagy szitálták-e az anyagot,

— a hőérzékenységi vizsgálatok során tett megfigyeléseket (például a minta tömege, száma stb.),

— a mechanikai hatással szembeni érzékenységvizsgálatok során tett megfigyeléseket (például jelentős mennyiségű füst képződése vagy teljes elbomlás csattanás nélkül, lángok, szikra, csattanás, sistergés, ropogás stb.),

— minden egyes típusú vizsgálat eredményét,

— ha alternatív készüléket használtak, meg kell adni az adott készülékkel kapott eredmények és az egyenértékű készülékkel kapott eredmények közötti korreláció tudományos indoklását, valamint prioritását,

▼B

— minden hasznos megjegyzést, ilyen például a hivatkozás a hasonló termékekkel végrehajtott vizsgálatokra, amely lényeges lehet az eredmények megfelelő értelmezéséhez,

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

3.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE ÉS ÉRTÉKELÉSE

A vizsgálati jelentésnek tartalmaznia kell minden hamis, rendellenes, illetve nem jellemző eredményt. Amennyiben a vizsgálatok közül bármelyiket figyelmen kívül kell hagyni, meg kell adni annak magyarázatát és minden alternatív vagy kiegészítő vizsgálat eredményeit. A rendellenes eredményt el kell fogadni névértéken, és az anyagot ennek megfelelően osztályozni kell, kivéve ha az eredmény megmagyarázható.

4. **SZAKIRODALOM**

(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

Függelék

Példa az anyag meghatározására a hőérzékenységvizsgálathoz (lásd a DIN 1623 szabványt)

(1) Cső: 1.0336.505 g számú anyagmeghatározás.

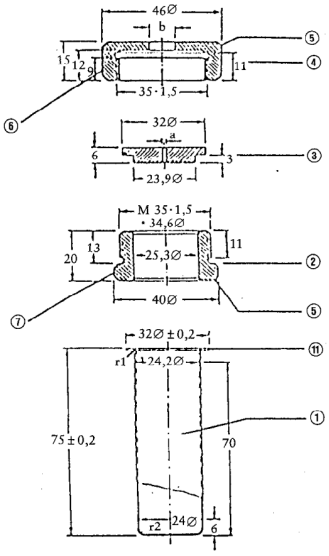
(2) Zárólemez: 1.4873 számú anyagmeghatározás.

(3) Menetes gyűrű és anya: 1.3817 számú anyagmeghatározás.

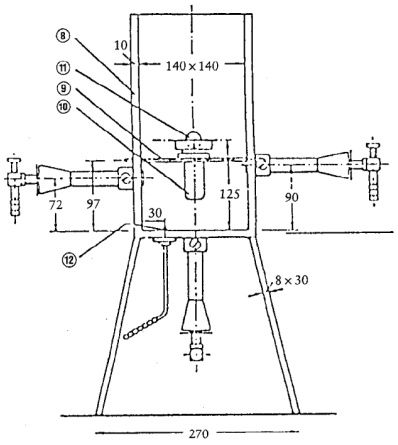
1. ábra

Hőérzékenységet vizsgáló készülék

(minden méret mm-ben van megadva)



1a. ábra. Acélcső és tartozékok



1b. ábra. Fűtő-és védőkészülék

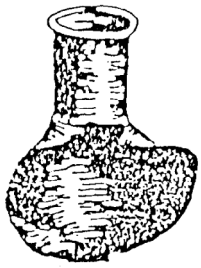
(1) cső
(1a) külső perem
(2) menetes gyűrű; kis súrlódású menet
(3) blende, a = 2,0 vagy 6,0 mm átmérő
(4) anya, b = 10 mm átmérő
(5) lekerekített felület
(6) 2 lemezfedél 41-es méretű villáskulcshoz
(7) 2 lemezfedél 36-os méretű villáskulcshoz
(8) repeszálló kamra
(9) 2 csőtartó rúd
(10) felszerelt cső
(11) hátsó égő helye; a többi égő látható
(12) gyújtócső

▼B

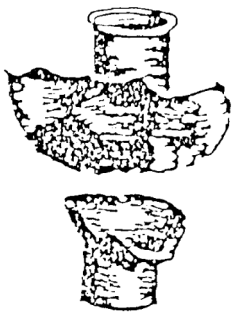
2. ábra

Hőérzékenység-vizsgálat

Példák a széttörésre



Nincs robbanás



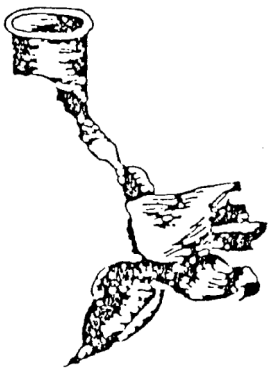
Nincs robbanás



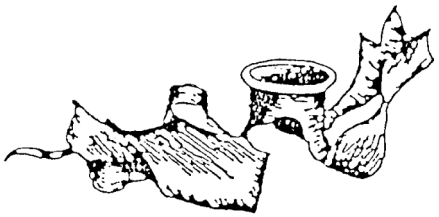
Robbanás



Robbanás



Robbanás

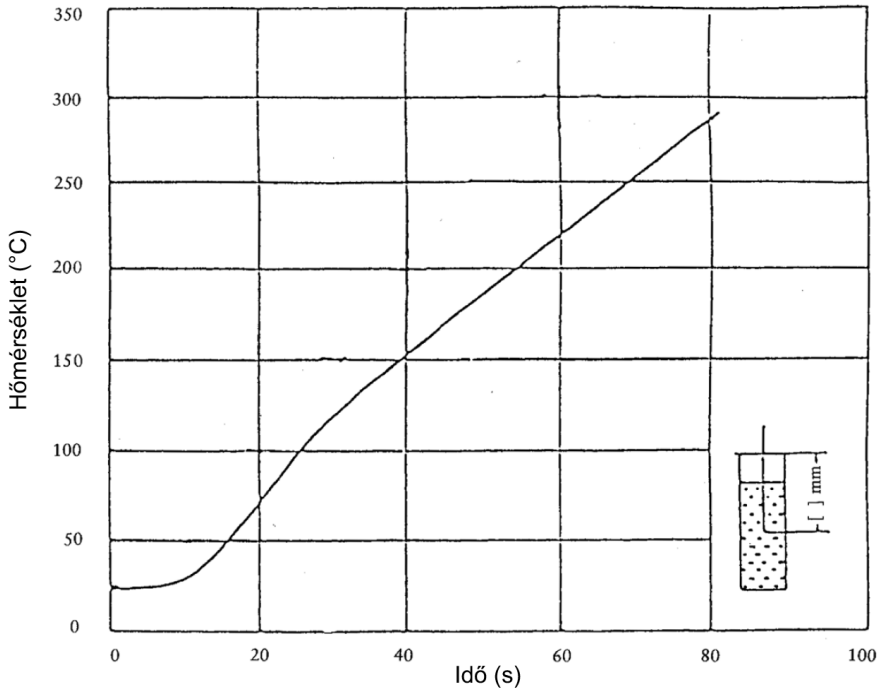


Robbanás

▼B

3. ábra

Hevítési sebesség kalibrációja a hőérzékenység-vizsgálathoz



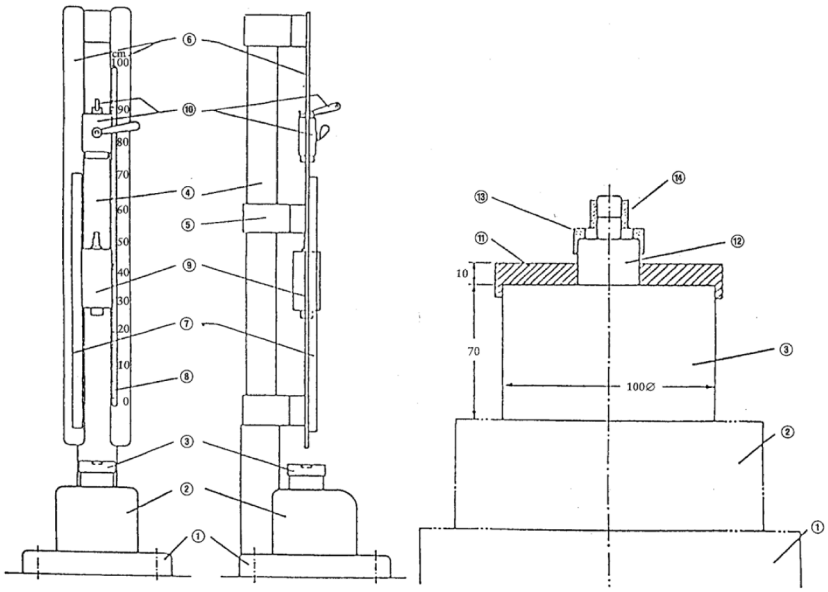
Egy zárt (1,5 mm-es zárólemez) csőben 3,2 liter/perces áramlási sebességű propán segítségével dibutil-ftalát (27 cm^3) melegítésekor kapott hőmérséklet/idő görbe. A hőmérsékletet egy 1 mm átmérőjű, középre, 43 mm-rel a cső pereme alá helyezett rozsdamentes acéllal bevont kromel/alumel termoelemmel mérik. 135 °C és 285 °C között a hevítési sebességnek 185 és 215 K/perc között kell lennie.

▼B

4. ábra

Ütési érzékenységet vizsgáló készülék

(minden méret mm-ben van megadva)



4a. ábra: Ejtőkalapács, elölnézet és oldalnézet, általános nézet

(1) alaptest, 450 × 450 × 60
(2) acéltömb, 230 × 250 × 200
(3) üllő, 100 átmérő × 70
(4) oszlop
(5) középső keretelem
(6) 2 vezetősín
(7) fogazott tartó

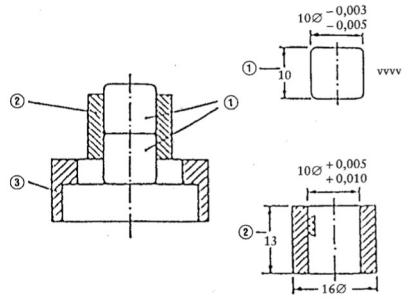
4b. ábra: Ejtőkalapács, alsó rész

(8) skála
(9) ejtőkalapács (leeső tömeg)
(10) tartó- és kioldókészülék
(11) rögzítőlemez
(12) közbenső üllő (cserélhető), 26 átmérő × 26
(13) centírozó gyűrű átfolyónyílásokkal
(14) ütőkészülék

▼B

4. ábra

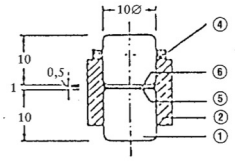
Folytatás

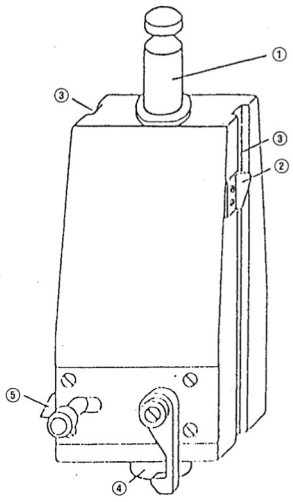


4c. ábra: Űtőkészülék por alakú vagy pépszerű anyagokhoz

4d. ábra: Ütőkészülék folyékony anyagokhoz

(1) acélhengerek
(2) vezetőgyűrű acélhengerekhez
(3) centírozógyűrű áramlásnyílásokkal
a) függőleges metszet
b) felülnézet
(4) gumigyűrű
(5) folyékony anyag (40 mm^3)
(6) folyadékmentes tér





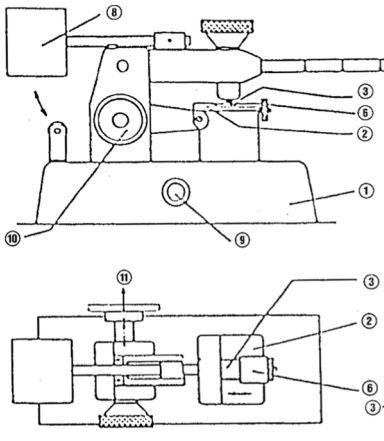
4e. ábra: Kalapács (5 kg-os leeső tömeg)

(1) felfüggesztő csap
(2) magasságjelző
(3) beállító vájat
(4) hengeres ütőfej
(5) visszaugró befogás

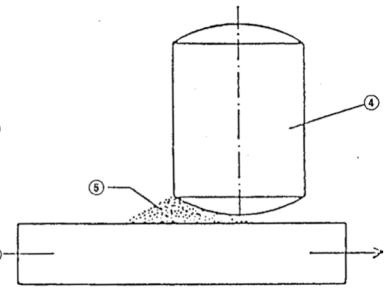
▼B

5. ábra

Súrlódási érzékenységet vizsgáló készülék



5a. ábra: Súrlódási érzékenységet vizsgáló készülék: függőleges nézet és felülnézet



5b. ábra: A mintán a henger kezdőhelyzete

(1) acélalap
(2) mozgatható kocsi
(3) porcelánlap, 25 × 25 × 5 mm, a kocsira rögzítve
(4) rögzített porcelánhenger, 10 mm átmérőjű × 15 mm
(5) vizsgált minta, körülbelül 10 mm^3
(6) hengertartó
(7) terhelő kar
(8) ellensúly
(9) kapcsoló
(10) kerék a kocsi kiindulási helyzetbe állításához
(11) a villanymotor felé mutató irány

▼B

A.15. **ÖNGYULLADÁSI HŐMÉRSÉKLET (FOLYADÉKOK ÉS GÁZOK)**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Robbanásveszélyes és környezeti hőmérsékleten levegővel érintkezve öngyulladó anyagokat nem lehet ezen eljárással vizsgálni. A vizsgálati eljárás olyan gázokhoz, folyadékokhoz és gőzökhöz alkalmazható, amelyek forró felülettel érintkezve meggyulladhatnak.

Az öngyulladási hőmérsékletet jelentős mértékben csökkentheti a katalitikus szennyeződések jelenléte, a felület anyaga vagy a vizsgálati tartály nagyobb térfogata.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Az öngyulladási képesség mértéke az öngyulladási hőmérséklet segítségével fejezhető ki. Az öngyulladási hőmérséklet az a legalacsonyabb hőmérséklet, amelyen a vizsgált anyag levegővel keverve meggyullad a vizsgálati módszerben meghatározott körülmények között.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

A szabványok tartalmazzák a referenciaanyagokat (lásd az 1.6.3. pontot). Ezeknek elsősorban a módszer megfelelőségének időnkénti ellenőrzésére és a más módszerekkel kapott eredményekkel való összehasonlítás lehetővé tételére kell szolgálniuk.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A módszer meghatározza valamely körülkerített tér belső felületének azt a minimális hőmérsékletét, amelynél meggyullad az e térbe fecskendezett gáz, gőz vagy folyadék.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Az ismételhetőség az öngyulladási hőmérsékletek tartományának és az alkalmazott vizsgálati módszernek megfelelően változik.

Az érzékenység és specifikusság az alkalmazott vizsgálati módszertől függ.

1.6. A MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Készülék**

A készüléket az 1.6.3. pontban említett módszer írja le.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

A vizsgált anyagmintát az 1.6.3. pontban említett módszernek megfelelően vizsgálják.

1.6.3. **A vizsgálat végrehajtása**

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

▼B

2. **ADATOK**

Regisztrálni kell a vizsgálati hőmérsékletet, a légköri nyomást, a felhasznált minta mennyiségét és a gyulladás bekövetkezéséig eltelt holtidőt.

3. **JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

— a felhasznált minta mennyiségét, a légköri nyomást,

— a vizsgálathoz használt készüléket,

— a mérések eredményeit (vizsgálati hőmérsékletek, gyulladással kapcsolatos eredmények, megfelelő holtidők),

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

4. **SZAKIRODALOM**

Nincs.

▼B

A.16. SZILÁRD ANYAGOK RELATÍV ÖNGYULLADÁSI HŐMÉRSÉKLETE

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

Robbanásveszélyes és környezeti hőmérsékleten levegővel érintkezve öngyulladó anyagokat nem szabad alávetni ennek a vizsgálatnak.

A vizsgálat célja előzetes információk biztosítása szilárd anyagok magas hőmérsékleteken bekövetkező öngyulladásáról.

Amennyiben az anyagnak oxigénnel történő reakciója, vagy az exoterm bomlás során fejlődő hő nem elég gyorsan áramlik a környezetbe, öngyulladáshoz vezető önmelegedés jön létre. Az öngyulladás tehát akkor következik be, amikor a hőtermelés üteme meghaladja a hőveszteség ütemét.

A vizsgálati eljárás hasznos mint előzetes szűrővizsgálat szilárd anyagoknál. Tekintettel a szilárd anyagok gyulladásának és égésének bonyolult természetére, e vizsgálati módszernek megfelelően meghatározott öngyulladási hőmérsékletet csak összehasonlítási célokra szabad használni.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Az e módszerrel kapott öngyulladási hőmérséklet az a ^{o}C-ban kifejezett minimális környezeti hőmérséklet, amelynél meghatározott körülmények között meghatározott mennyiségű anyag meggyullad.

1.3 REFERENCIAANYAG

Nincs.

1.4 A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Meghatározott térfogatú vizsgált anyagot szobahőmérsékletű kemencébe helyeznek; majd regisztrálják a minta közepére vonatkozó hőmérséklet/idő görbét, miközben a kemence hőmérsékletét 0,5^{o}C/perc sebességgel 400 ^{o}C-ra vagy olvadáspontra emelik, amennyiben az kisebb 400 ^{o}C-nál. E vizsgálat alkalmazásában öngyulladási hőmérséklet a kemencének az a hőmérséklete, amelynél a minta hőmérséklete önmelegedéssel eléri a 400 ^{o}C-t.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincs.

1.6. A MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Készülék**

1.6.1.1. *Kemence*

Természetes levegőkeringtetéssel és robbanás elleni szeleppel ellátott, hőmérsékletprogramozott laboratóriumi kemence (körülbelül 2 liter térfogatú). A lehetséges robbanásveszély elkerülése érdekében nem szabad engedni, hogy bármilyen gáz-halmazállapotú bomlástermék kapcsolatba lépjen az elektromos fűtőelemekkel.

▼B

1.6.1.2. *Drótháló kocka*

Az 1. ábrán látható mintának megfelelő 0,045 mm-es nyílásokkal rendelkező, rozsdamentes acél dróthálót kell kivágni. A hálót össze kell hajtogatni nyitott tetejű kockává, és huzallal rögzíteni kell.

1.6.1.3. *Termoelemek*

Alkalmas termoelemek.

1.6.1.4. *Regisztráló készülék*

Bármely, 0-tól 600 °C-ig vagy ennek megfelelő feszültségre kalibrált, kétcsatornás regisztráló készülék.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

Az anyagokat az átvételüknek megfelelő állapotukban vizsgálják.

1.6.3. **A vizsgálat végrehajtása**

A kockát megtöltik a vizsgált anyaggal, és gyenge ütögetéssel tömörítik, majd további anyagot adnak hozzá, amíg teljesen meg nem telik a kocka. A kockát ezután szobahőmérsékleten felfüggesztik a kemence közepén. Az egyik termoelemet a kocka közepére helyezik, a másikat a kocka és a kemence fala közé a kemence hőmérsékletének regisztrálására.

A kemence és a minta hőmérsékletét folyamatosan regisztrálják, miközben 0,5°C/perc sebességgel 400 °C-ra, vagy ha az olvadási pont ennél alacsonyabb, akkor az olvadási pontra növelik a kemence hőmérsékletét.

Amennyiben az anyag meggyullad, a mintában lévő termoelem nagyon hirtelen hőmérsékletnövekedést fog mutatni a kemence hőmérsékletéhez képest.

2. **ADATOK**

Az értékeléshez lényeges a kemencének az a hőmérséklete, amelynél a minta hőmérséklete önmelegedéssel eléri a 400 °C-ot (lásd a 2. ábrát).

3. **JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— a vizsgált anyag leírását,

— a mérés eredményeit, a hőmérséklet/idő görbét is ideértve,

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

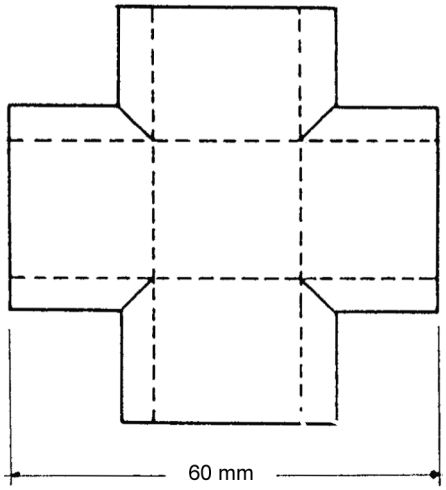
4. **SZAKIRODALOM**

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

▼B

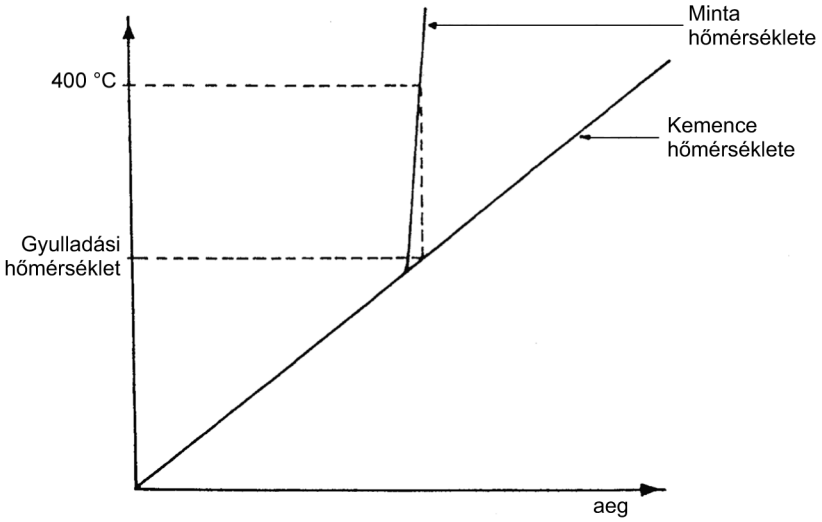
1. ábra

20 mm-es vizsgálati kocka sémája



2. ábra

Jellegzetes hőmérséklet/idő görbe



▼B

A.17. OXIDÁLÓ TULAJDONSÁGOK (SZILÁRD ANYAGOK)

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag minden lehetséges robbanási tulajdonságáról.

Ez a vizsgálat nem alkalmazható folyadékokhoz, gázokhoz, robbanásveszélyes vagy tűzveszélyes anyagokhoz vagy szerves peroxidokhoz.

A vizsgálatot nem kell végrehajtani, ha a szerkezeti képlet vizsgálata minden kétség nélkül kimutatja, hogy az anyag nem képes exoterm reakcióba lépni éghető anyaggal.

Előzetes vizsgálatot kell végrehajtani annak megállapítására, hogy különleges óvintézkedésekkel kell-e végrehajtani a vizsgálatot.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁS ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Égési idő: az 1.6. pontban leírt eljárást követve, az a másodpercben meghatározott reakcióidő, amely alatt a reakciózónában az égés az anyagnyaláb mentén szétterjed.

Égési sebesség: milliméter/szekundumban kifejezve.

Maximális égési sebesség: 10–90 tömegszázalékban oxidálószert tartalmazó keverékekkel kapott égési sebességek közül a legnagyobb érték.

1.3. REFERENCIAANYAG

A vizsgálathoz és az előzetes vizsgálathoz referenciaanyagként (analitikai tisztaságú) bárium-nitrátot használnak.

A referenciakeverék az a bárium-nitrátnak cellulózporral alkotott, az 1.6. pontnak megfelelően elkészített (rendszerint 60 tömegszázalékos bárium-nitrátot tartalmazó) keveréke, amelynek maximális az égési sebessége.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Biztonsági okokból előzetes vizsgálatot hajtanak végre. Nincs szükség további vizsgálatra, amennyiben az előzetes vizsgálat világosan jelzi, hogy a vizsgált anyagnak oxidáló tulajdonságai vannak. Ellenkező esetben az anyagot teljes vizsgálatnak kell alávetni.

A teljes vizsgálat során a vizsgált anyag és valamilyen meghatározott éghető anyag különböző arányú keverékét kell alkalmazni. Ezután minden egyes keverékből kialakítanak egy halmot, és a halmot az egyik végén meggyújtják. A meghatározott maximális égési sebességet összehasonlítják a referenciakeverék maximális égési sebességével.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Amennyiben szükséges, az őrlés és keverés bármilyen módszere megfelel, feltéve hogy a hat különálló vizsgálatban a maximális égési sebesség 10 %-nál nem nagyobb mértékben tér el a számtani középértéktől.

▼B

1.6. A MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészítés**

1.6.1.1. *A vizsgált anyag*

A vizsgált anyagot < 0,125 mm-es részecskeméretűre őrlik a következő eljárás segítségével: a vizsgált anyag szitálása, a visszamaradó anyag őrlése, az eljárás megismétlése, amíg a teljes vizsgált anyag keresztül nem halad a szitán.

A minőségi követelménynek megfelelő bármilyen őrlési és szitálási módszer használható.

A keverék előkészítése előtt az anyagot 105 °C hőmérsékleten súlyállandóságig szárítják. Amennyiben a vizsgált anyag bomlási hőmérséklete 105 °C alatt van, az anyagot alacsonyabb hőmérsékleten kell megszárítani.

1.6.1.2. *Éghető anyag*

Éghető anyagként por alakú cellulózt használnak. A cellulóznak vékonyfilm- vagy oszlopkromatográfiához használt típusúnak kell lennie. A szálhosszúság több mint 85 %-a 0,020 és 0,075 mm között legyen. A cellulózport egy 0,125 mm nyílásméretű szitán áttörik. Ugyanabból a gyártási sorozatból származó cellulózt kell használni a teljes vizsgálat során.

A keverék előkészítése előtt a porított cellulózt 105 °C-on súlyállandóságig szárítják.

Amennyiben falisztet használnak az előzetes vizsgálatnál, akkor puha falisztet kell készíteni, amely átmegy egy 1,6 mm nyílásméretű szitán, ezt alaposan meg kell keverni, majd 105 °C hőmérsékleten 4 órán át kell szárítani 25 mm-nél nem vastagabb rétegben. Ezután le kell hűteni, és amíg szükséges – legfeljebb a szárítástól számított 24 órán keresztül – légmentes tartályban kell tárolni, amelyet a lehető legjobban meg kell tölteni.

1.6.1.3. *Gyújtóforrás*

Gyújtóforrásként gázégőből (minimális átmérője 5 mm) kiáramló forró lángot kell használni. Amennyiben más gyújtóforrást használnak (például inert légkörben végrehajtott vizsgálatkor), a jelentésben meg kell adni annak leírását és indoklását.

1.6.2. **A vizsgálat végrehajtása**

Megjegyzés:

Az oxidálószereknek cellulózzal vagy falisztttel alkotott keverékeit robbanásveszélyesnek kell tekinteni, és kellő gondossággal kell kezelni.

1.6.2.1. *Előzetes vizsgálat*

A szárított anyagot alaposan összekeverik szárított cellulózzal vagy falisztttel 2 vizsgáltanyag-tömegrész – 1 cellulóz- vagy faliszt-tömegrész arányban, és a keveréket kis, kúp alakú, 3,5 cm (az alap átmérője) × 2,5 cm-es (magasság) halomba formálják egy kúp alakú forma (például lezárt szárú laboratóriumi üvegtölcsér) tömörítés nélküli megtöltésével.

▼B

A halmot egy hideg, nem éghető, nem porózus és alacsony hővezető-képességű alaplemezre helyezik. A vizsgálatot az 1.6.2.2. pontnak megfelelően füstszekrényben kell végrehajtani.

A gyújtóforrást érintkezésbe hozzák a kúppal. Megfigyelik és regisztrálják az ennek eredményeként létrejövő reakció erőteljességét és időtartamát.

Az anyagot oxidálónak kell tekinteni, ha erőteljes a reakció.

Minden esetben, ahol kételyek merülnek fel az eredménnyel kapcsolatban, végre kell hajtani az alábbiakban leírt teljes vizsgálatsorozatot.

1.6.2.2. *Vizsgálatsorozat*

10 %-os intervallumokban, 10–90 tömegszázalékban oxidálószert tartalmazó oxidálószer/cellulózkeverékeket készítenek. Határesetekhez közbenső oxidáló szer/cellulózkeverékeket kell használni azért, hogy pontosabb legyen a kapott maximális égési sebesség.

A halmot forma segítségével alakítják ki. A háromszög keresztmetszetű forma fémből készült, hossza 250 mm, belső magassága 10 mm és belső szélessége 20 mm. A forma mindkét oldalán hosszirányban két fémlemezt szereltek fel oldallapként, amelyek 2 mm-rel túlnyúlnak a háromszög alakú keresztmetszet felső szélén (lásd az ábrát). Ezt az eszközt lazán megtöltik a szükségesnél kissé több keverékkel. Miután a formát egyszer 2 cm-es magasságból szilárd felületre ejtették, a megmaradó felesleges anyagot lekaparják egy ferdén elhelyezett lappal. Az oldallapokat eltávolítják, és a megmaradt por felületét kisimítják egy henger segítségével. Ezután a forma tetejére nem éghető, nem porózus és alacsony hővezetőképességű alaplemezt helyeznek, a készüléket megfordítják, és eltávolítják a formát.

A halmot a füstszekrény huzatába helyezik.

A levegő sebességének elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy megakadályozza az égéstermékek laboratóriumba szökését, és azt a vizsgálat során megváltoztatni nem szabad. A berendezés köré huzatellenzőt kell szerelni.

A cellulóz és néhány vizsgált anyag vízfelvevő képessége miatt a vizsgálatot a lehető leggyorsabban kell végrehajtani.

Meggyújtják a halom egyik végét úgy, hogy hozzáérintik a lángot.

A reakcióidőt 200 mm-es távolság mentén mérik, miután a reakciózóna már 30 mm távolságra terjedt.

A vizsgálatot a referenciaanyaggal és a vizsgált anyagnak a cellulózzal alkotott keverékei mindegyikével legalább egyszer végrehajtják.

Amennyiben megállapítják, hogy a maximális égési sebesség lényegesen nagyobb, mint amelyet a referenciakeverékből kaptak, a vizsgálat megszakítható; egyébként a vizsgálatot ötször meg kell ismételni a legnagyobb égési sebességet adó három keverék mindegyikével.

▼B

Amennyiben az eredmény gyaníthatóan hamis pozitív, a vizsgálatot meg kell ismételni cellulóz helyett ehhez hasonló részecskeméretű inert anyag, például kovaföld segítségével. Más megoldásként a legnagyobb égési sebességű vizsgált anyag/cellulózkeveréket újra meg kell vizsgálni inert légkörben (< 2 térfogatszázalék oxigéntartalom).

2. **ADATOK**

Biztonsági okokból a maximális égési sebességet – és nem a középértéket – kell a vizsgált anyag jellemző oxidáló tulajdonságának tekinteni.

Az értékeléshez adott keverék hat vizsgálatából álló vizsgálatsorozatán belül az égési sebesség legnagyobb értéke a fontos.

Fel kell rajzolni minden egyes keverék legnagyobb égési sebességének görbéjét az oxidálószer koncentrációja függvényében. A görbéből kell megállapítani a maximális égési sebességet.

A maximális égési sebességű keverék vizsgálatából kapott hat mért égési sebesség értékének nem szabad 10 %-nál nagyobb mértékben eltérnie a számtani középértéktől; ellenkező esetben javítani kell az őrlési és keverési módszereken.

Össze kell hasonlítani a kapott maximális égési sebességet a referenciaanyag maximális égési sebességével (lásd az 1.3. pontot).

Amennyiben a vizsgálatokat inert légkörben hajtják végre, a maximális reakciósebességet összehasonlítják a referenciakeverék inert légkörben kapott maximális reakciósebességével.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— a vizsgált anyag azonosságát, összetételét, tisztaságát, nedvességtartalmát stb.,

— a vizsgált minta minden kezelését (például őrlés, szárítás, …),

— a vizsgálatok során használt gyújtóforrást,

— a mérések eredményeit,

— a reakció módját (például felvillanással égés a felületen, a teljes tömegen keresztüli égés, az égéstermékekre vonatkozó minden információ, …),

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést, ilyen például a hevesség (lángolás, szikrázás, füstölgés, lassú izzás stb.) leírása, és mind a vizsgált, mind a referenciaanyag előzetes biztonsági/szűrési vizsgálata során kapott közelítő időtartam,

— inert anyaggal végrehajtott vizsgálatokból kapott eredményeket, amennyiben van ilyen,

— inert légkörben végrehajtott vizsgálatokból kapott eredményeket, amennyiben van ilyen.

▼B

3.2. AZ EREDMÉNY ÉRTELMEZÉSE

Valamely anyagot oxidáló anyagnak kell tekinteni, amikor:

a) az előzetes vizsgálat során erőteljes reakció jön létre;

b) a teljes vizsgálat során a vizsgált keverékek maximális égési sebessége nagyobb vagy egyenlő, mint a cellulóz és a bárium-nitrát alkotta referenciakeverék maximális égési sebessége.

A hamis pozitív eredmény elkerülése érdekében az inert anyaggal kevert anyag vizsgálatakor és/vagy inert légkörben végrehajtott vizsgálatkor kapott eredményeket figyelembe kell venni az eredmények értelmezésekor.

4. **SZAKIRODALOM**

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

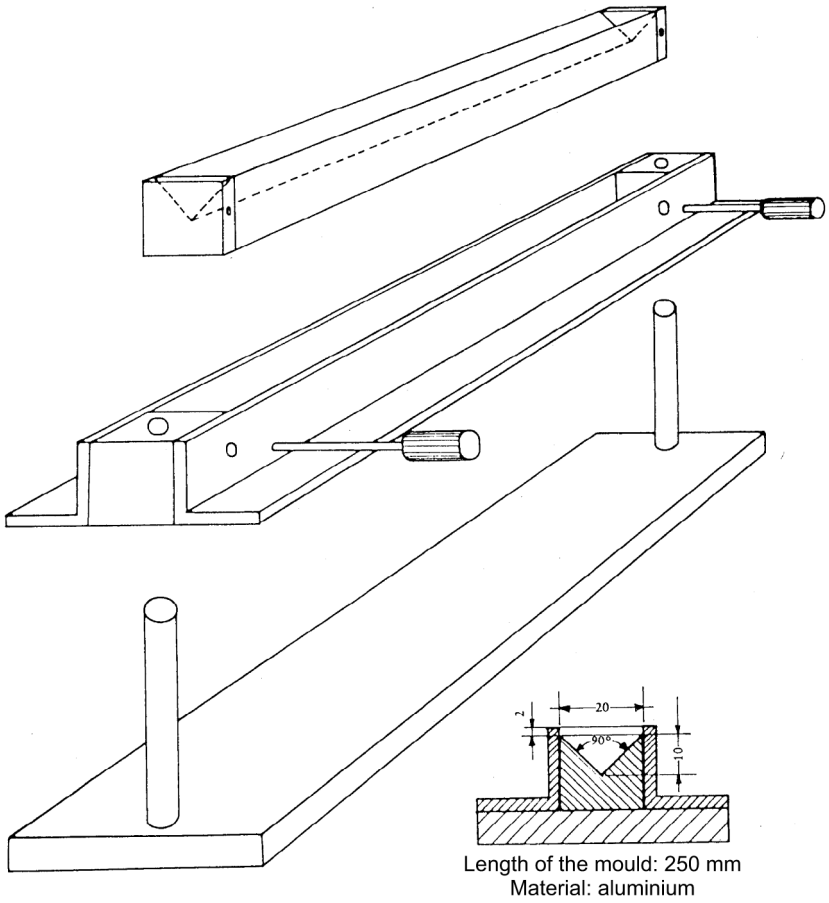
▼B

Függelék

Ábra

Forma és tartozékok a halom elkészítéséhez

(Minden méret mm-ben van megadva)



▼B

A.18. A POLIMEREK SZÁMÁTLAG SZERINTI MOLEKULATÖMEGE ÉS MOLEKULATÖMEG-ELOSZLÁSA

1. MÓDSZER

E gél permeációs kromatográfiás módszer megfelel az OECD TG 118-nak (1996). Az alapelvek és további technikai információk az 1. hivatkozásban találhatók.

1.1. BEVEZETÉS

Mivel a polimerek tulajdonságai olyan változatosak, lehetetlen egyetlen módszert leírni, pontosan felsorolva az elválasztás és kiértékelés feltételeit, amelyek lefednek minden, a polimerek elválasztásánál előforduló eshetőséget és különlegességet. Különösen a komplexpolimer rendszereknél gyakran nem használható a gél permeációs kromatográfia (GPC). Amennyiben a GPC nem használható, a molekulatömeg más módszerekkel határozható meg (lásd a függeléket). Ilyen esetekben meg kell adni a használt módszer valamennyi részletét és igazolását.

A leírt módszer az 55672 DIN szabványon alapul (1). Ebben a DIN szabványban található részletes információ a kísérletek kivitelezéséről és az adatkiértékelésről. Amennyiben a kísérleti körülmények módosítása szükséges, a változtatásokat igazolni kell. Más szabvány is használható, amennyiben teljes körű hivatkozással rendelkezik. A leírt módszer kalibrációra ismert polidiszperzitású polisztirol mintákat használ, és esetleg módosítani kell, hogy megfelelő legyen bizonyos polimereknél, pl.: vízben oldható és hosszú láncú elágazó polimerek.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Az M_n számátlag molekulatömeget és az M_w tömegátlag molekulatömeget az alábbi egyenletekkel lehet meghatározni:

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

ahol

H_i a detektorjel szintje az alapvonaltól V_i retenciós térfogatra,

M_i a polimerfrakció molekulatömege V_i retenciós térfogatnál, és

n az adatpontok száma.

A molekulatömeg eloszlásának szélességét, ami a rendszer diszperzitásának mértéke, az M_w/M_n arány adja meg.

▼B

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Kalibrációt kell készíteni, mert a GPC relatív módszer. Keskeny eloszlású, lineárisan felépített, ismert M_n és M_w átlagos molekulatömegű, és ismert molekulatömeg eloszlású polisztirol standardokat használnak e célra. Az ismeretlen minta molekulatömegének meghatározására a kalibrációs görbe csak akkor használható, amennyiben a minta és a standardok elválasztásának körülményei azonos módon lettek kiválasztva.

A molekulatömeg és az elúciós térfogat között meghatározott kapcsolat csak az adott kísérlet sajátos körülményei között érvényes. A körülmények magukban foglalják mindenek felett a hőmérsékletet, az oldószert (vagy oldószerkeveréket), a kromatográfiás feltételeket és az elválasztó oszlopot vagy oszlopokat.

A minta így meghatározott molekulatömegei relatív értékek és „polisztirol ekvivalens molekulatömeg”-ként írták le őket. Ez azt jelenti, hogy a minta és a standard szerkezeti és kémiai különbségeitől függően a molekulatömegek kisebb-nagyobb mértékben eltérhetnek az abszolút értéktől. Amennyiben más standardokat használtak, pl. polietilén-glikol, polietilén-oxid, polimetil-metakrilát, poliakrilsav, azt meg kell indokolni.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A minta molekulatömeg-eloszlása és az átlagos molekulatömegek (M_n, M_w) GPC-vel meghatározhatók. A GPC a folyékony kromatográfia speciális típusa, aminél a minta az egyes alkotók hidrodinamikai térfogata szerint választódik el (2).

Az elválasztás a minta porózus anyaggal, tipikusan szerves géllel töltött oszlopon való áthaladásakor valósul meg. Kis molekulák be tudnak hatolni a pórusokba, a nagy molekulák nem. A nagy molekulák útja ezért rövidebb, és elsőként eluálódnak. A közepes méretű molekulák a pórusok egy részébe behatolnak, és később eluálódnak. A legkisebb, a gél pórusainál kisebb átlagos hidrodinamikai sugarú molekulák minden pórusba be tudnak hatolni. Ezek eluálódnak utoljára.

Ideális helyzetben az elválasztást teljesen a molekulafajták mérete szabja meg, de a gyakorlatban nehéz elkerülni valamely abszorpciós hatás közrehatását. A nem egyenletes oszlopfeltöltés és a holttérfogat ronthatja a helyzetet (2).

A detektálás megvalósul pl. a törésmutatóval vagy az UV-elnyeléssel, és egyszerű eloszlási görbét eredményez. Azonban ahhoz, hogy a tényleges molekulatömeg-értékeket a görbéhez lehessen rendelni, az oszlopot kalibrálni kell ismert molekulatömegű és ideális esetben nagyjából hasonló szerkezetű polimerek, pl. különböző polisztirol standardok futtatásával. Tipikusan Gauss-görbe kapható, néha a kis molekulatömeg oldalán kis farokkal eltorzítva, a függőleges tengely a különböző eluált molekulafajták tömeg szerinti mennyiségét, a vízszintes tengely a molekulatömeg logaritmusát mutatja.

▼B

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Az elúciós térfogat reprodukálhatósága (relatív standard deviáció, RSD) 0,3 %-nál jobb kell, hogy legyen. Az analízis megkövetelt reprodukálhatóságát belső standarddal való korrekcióval kell biztosítani, amennyiben a kromatogramot az idő függvényében értékelik ki, és nem felel meg a fent említett követelménynek (1). A polidiszperzitás függ a standardok molekulatömegétől. Polisztirol standardoknál a tipikus értékek:

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

(M_p a standard molekulatömege a csúcsmaximumnál)

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **A standard polisztirol oldatok készítése**

A polisztirol standardokat óvatosan keverve oldják fel a választott eluensben. A gyártó ajánlásait számításba kell venni az oldatok készítésénél.

A választott standardok koncentrációja különböző faktoroktól függ, pl. injektált térfogat, az oldat viszkozitása és az elemző detektor érzékenysége. A túltöltés elkerülése érdekében a maximális injektált térfogatot az oszlop hosszához kell igazítani. 30 cm × 7,8 mm-es oszlopú GPC-vel történő analitikai elválasztásoknál a jellemző injektált térfogat rendesen 40 és 100 µl között van. Nagyobb térfogat is elképzelhető, de nem lépheti túl a 250 µl-t. Az oszlop aktuális kalibrációja előtt meg kell határozni az injektált térfogat és a koncentráció optimális arányát.

1.6.2. **A mintaoldat elkészítése**

Elvben a mintaoldatok elkészítésére is ugyanezek a követelmények érvényesek. A mintát megfelelő oldószerben pl. tetrahidro-furán (THF) óvatos rázással oldják fel. Semmilyen körülmények között sem szabad ultrahangos fürdőben feloldani. Amennyiben szükséges, az oldat tisztítható 0,2–2 µm-es pórusméretű membránszűrővel.

A feloldatlan részecskék jelenlétét, amik nagy molekulatömegű fajták miatt fordulhatnak elő, fel kell jegyezni a végleges jelentésben. A feloldott részecskék tömegszázalékának meghatározására megfelelő módszert kell alkalmazni. Az oldatot 24 órán belül fel kell használni.

1.6.3. **Készülék**

— oldószertartály,

— gáztalanító (szükség szerint),

— pumpa,

▼B

— rezgéscsillapító (szükség szerint),

— injektáló rendszer,

— kromatográfiás oszlopok,

— detektor,

— áramlásmérő (szükség szerint),

— adat rögzítő-feldolgozó,

— hulladéktároló.

Biztosítani kell, hogy a GPC rendszer inert legyen a használt oldószerekkel szemben (pl. THF oldószernél acélkapillárisok használata).

1.6.4. **Injektáló és oldószerszállító rendszer**

A minta oldatának meghatározott térfogatát automataadagolóval vagy kézzel töltik az oszlopra egy pontosan meghatározott zónába. Amennyiben kézzel végzik, a fecskendő dugattyújának túl gyors benyomása vagy kihúzása a megfigyelt molekulatömeg-eloszlásban változásokat okozhat. Az oldószert szállító rendszernek, amennyire csak lehet, lüktetésmentesnek kell lenni, ideálisan rezgéscsillapítót magában foglalva. Az áramlási sebesség 1 ml/perc nagyságrendű.

1.6.5. **Oszlop**

A mintától függően a polimert egy egyszerű, vagy több, sorba kötött oszlopot használva jellemeznek. Számos meghatározott tulajdonságokkal (pl. pórusméret, szelektivitási határérték) rendelkező porózus oszlopanyag elérhető a kereskedelemben. Az elválasztó gél vagy az oszlophossz megválasztása a minta tulajdonságaitól (pl. hidrodinamikai térfogatok, molekulatömeg-eloszlás) és az elválasztás sajátos körülményeitől, pl. oldószer, hőmérséklet és áramlási sebesség is függ (1) (2) (3).

1.6.6. **Elméleti tányérszám**

Az elválasztásra használt oszlopot vagy oszlopkombinációt az elméleti tányérszámmal kell jellemezni. A THF eluáló oldószer esetében ez magában foglalja etil-benzol vagy más, megfelelő nem poláris oldat töltését ismert hosszúságú oszlopra. Az elméleti tányérszámot a következő egyenlet adja meg:

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

ahol:

N = az elméleti tányérszám

V_e = az elúciós térfogat a csúcsmaximumnál

▼B

W = az alapvonal csúcsszélesség

$W_{1/2}$ = a csúcsszélesség félmagasságnál.

1.6.7. **Az elválasztás hatékonysága**

Az elméleti tányérszámon kívül, ami a sávszélességet meghatározó mennyiség, az elválasztás hatékonyságának is van szerepe, amit a kalibrációs görbe meredeksége határoz meg. Egy oszlop elválasztási hatékonyságát a következő kapcsolat adja meg:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{az oszlop keresztmet szetének t erülete}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

ahol:

$V_{e,\ Mx}$ = az M_x molekulatömegű polisztirol elúciós térfogata

$V_{e,(10.Mx)}$ = a 10-szer nagyobb molekulatömegű polisztirol elúciós térfogata.

A rendszer felbontása általában így definiált:

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

Ahol

V_{e1}, V_{e2} = két polisztirol standard elúciós térfogata a csúcsmaximumnál

W_1, W_2 = az alapvonal csúcsszélességei

M_1, M_2 = a molekulatömegek a csúcsmaximumnál (10-es faktorral térjenek el).

Az oszloprendszerre az R-értéknek nagyobbnak kell lennie mint 1,7 (4).

1.6.8. **Oldószerek**

Minden oldószernek nagy tisztaságúnak kell lennie (THF-ből 99,5 %-os tisztaságút használnak). Az oldószertartálynak (inertgáz-atmoszférában, amennyiben szükséges) elég nagynak kell lenni az oszlop kalibrálásához és néhány mintaanalízishez. Az oldószert gáztalanítani kell, mielőtt a pumpával az oszlopra juttatják.

1.6.9. **Hőmérséklet-szabályozás**

A kritikus belső komponensek (injektáló hurok, oszlopok, detektor, csövezés) hőmérsékletét állandó és az oldószerválasztásnak megfelelő értéken kell tartani.

▼B

1.6.10. **Detektor**

A detektor célja az oszlopról eluált minta koncentrációjának mennyiségi rögzítése. A csúcsok szükségtelen szélesedésének elkerülésére a detektorcella követta térfogatának a lehető legkisebbnek kell lenni. Nem lehet nagyobb 10 µl-nél, kivéve a fényszórási és viszkozitásdetektoroknál. A detektálásra differenciális törésmutató-mérést szokás használni. Azonban, ha a minta vagy az elúciós oldószer sajátos tulajdonságai megkövetelik, más detektortípusok is használhatók, pl. UV/látható fény, IR, viszkozitásdetektor stb.

2. **ADATOK ÉS JELENTÉS**

2.1. ADATOK

A DIN szabványra (1) kell hivatkozni a részletes értékelési követelménynél éppúgy, mint az adatgyűjtéssel és -feldolgozással kapcsolatos követelményeknél.

Minden mintánál két független kísérletet kell végezni. Külön-külön kell azokat elemezni.

M_n-t, M_w-t, M_w/M_n-t és M_p-t meg kell adni minden mérésnél. Fontos egyértelműen jelezni, hogy a mért értékek a használt standard molekulatömegével ekvivalens relatív értékek.

A retenciós térfogatok, vagy a retenciós idők (lehetőleg belső standardot használva korrigáltak) meghatározása után a log M_p értékek (M_p a kalibráló standard csúcsmaximuma) lesznek ábrázolva egyikük függvényében. Molekulatömeg-dekádonként legalább két kalibrációs pont szükséges, és legalább öt mérési pont kell a teljes görbéhez, aminek le kell fedni a minta becsült molekulatömegét. A kalibrációs görbe kis molekulatömegű végpontját n-hexil-benzol, vagy más megfelelő nem poláris oldott anyag definiálja. A számátlag és a tömegátlag molekulatömeget általában elektronikus adatfeldolgozással, az 1.2. pont képletei alapján határozzák meg. A kézi digitalizálás esetében az ASTM D 3536-91 használható (3).

Az eloszlási görbét táblázat vagy ábra (differenciális frekvencia, vagy összegszázalék a log M függvényében) formájában kell megadni. Grafikus ábrázolásnál egy molekulatömeg-dekádnak általában kb. 4 cm szélesnek kell lennie, a csúcsmaximumnak pedig kb. 8 cm magasnak kell lennie. Integrál eloszlási görbék esetében az ordinátában a különbségnek 0 és 100 % között kb. 10 cm-esnek kell lenni.

2.2. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek az alábbi információkat kell tartalmaznia:

2.2.1. **Vizsgált anyag**

— elérhető információk a vizsgált anyagról (azonosság, adalékanyag, szennyező anyag),

▼B

— a mintakezelés, megfigyelések, problémák leírása.

2.2.2. **Műszerezettség**

— eluens tartály, inert gáz, az eluens gáztalanítása, az eluens összetétele, szennyezők,

— pumpa, rezgéscsillapító, injektáló rendszer,

— elválasztó oszlopok (a gyártó, az oszlop jellemzőiről minden információ, mint pórusméret, az elválasztó anyag fajtája stb., a használt oszlopok száma, hossza és elrendezése),

— az oszlop (vagy oszlopkombináció) elméleti tányérszáma, elválasztás hatékonysága (a rendszer felbontása),

— információ a csúcsok szimmetriájáról,

— oszlophőmérséklet, hőmérséklet-szabályozás módja,

— detektor (mérési elv, típus, követtatérfogat),

— áramlásmérő, amennyiben használva lett (gyártó, mérési elv),

— adatrögzítő és -feldolgozó rendszer (hardver és szoftver).

2.2.3. **A rendszer kalibrálása**

— a kalibrációs görbék megalkotásához használt módszer részletes leírása,

— információk a módszer minőségi követelményeiről (pl. korrelációs együttható, eltérés négyzetösszege stb.),

— információk minden, a kísérleti eljárás és az adatok kiértékelése és feldolgozása során alkalmazott extrapolációról, feltételezésről és közelítésről,

— a kalibrációs görbék megalkotásához használt minden mérést dokumentálni kell egy táblázatban, amely minden kalibrációs pont esetében az alábbiakat tartalmazza:

  — a minta neve,

  — a minta gyártója,

  — az M_p, M_n, M_w, és M_w/M_n standardok jellemző értékei, ahogy azokat a gyártó rendelkezésre bocsátotta, vagy az azt követő mérésekből következnek, a meghatározási módszer részleteivel együtt,

  — injektálási térfogat és koncentráció,

▼B

— a kalibrációhoz használt M_p érték,

— a csúcsmaximumoknál mért elúciós térfogat, vagy korrigált retenciós idő,

— a csúcsmaximumnál számított M_p,

— a számított M_p és a kalibrációs érték százalékos hibája.

2.2.4. **Kiértékelés:**

— időn alapuló kiértékelés: a megkövetelt reprodukálhatóság biztosítására használt módszerek (korrekciós módszer, belső standard stb.),

— információ arról, hogy a kiértékelés az elúciós térfogat vagy a retenciós idő alapján történt,

— információ a kiértékelés korlátairól, amennyiben nem elemeztek egy csúcsot teljesen,

— a kiegyenlítési módszerek leírása, amennyiben használva lettek,

— minta-előállítási és -előkezelési eljárások,

— feloldatlan részecskék jelenléte, amennyiben voltak,

— injektálási térfogat (μl) és injektálási koncentráció (mg/ml),

— az ideális GPC profiltól való eltéréshez vezető hatásokat jelző megfigyelések,

— a vizsgálati eljárások minden módosításának részletes leírása,

— a hibatartományok részletei,

— az eredmények értelmezésére vonatkozó bármely egyéb információ és megfigyelés.

3. **IRODALOMJEGYZÉK**

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

(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 Polistyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Függelék

Példák polimerek számátlag molekulatömege (M_n) meghatározásának más módszereire

M_n meghatározására a gél permeációs kromatográfia (GPC) az előnyben részesített módszer, különösen, ha elérhető a polimeréhez hasonló szerkezetű standardkészlet. Azonban, ha gyakorlati nehézségekbe ütközik a GPC használata, vagy amennyiben számítani lehet arra, hogy nincs megfelelő érték az M_n számára (és ami igazolást igényel), alternatív módszerek alkalmazhatók, úgymint:

1. **A kolligatív tulajdonságok felhasználása**

1.1. Ebullioszkópia/krioszkópia:

az oldószer polimer hozzáadásával kiváltott forráspont-emelkedésének (ebullioszkópia), vagy fagypont-csökkenésének (krioszkópia) mérése. A módszer azon a tényen alapul, hogy az oldott polimer hatása a folyadék forrás/fagypontjára a polimer molekulatömegétől függ (1) (2).

Alkalmazhatóság: $M_n < 20\,000$.

1.2. Gőznyomás csökkentése:

a kiválasztott referenciafolyadék gőznyomásának mérése ismert mennyiségű polimer hozzáadása előtt és után (1) (2).

Alkalmazhatóság: $M_n < 20\,000$ (elméletben; gyakorlatban azonban korlátozott értékű).

1.3. Membrán ozmometria:

az ozmózis elvén alapul, azaz, hogy az oldószer-molekulák hajlamosak híg oldatból a tömény oldatba átmenni egy félig áteresztő membránon keresztül, hogy egyensúly jöjjön létre. A vizsgálatnál a híg oldat nulla koncentrációjú, a tömény oldat pedig a polimert tartalmazza. Az oldószer átvándorlása a membránon keresztül nyomáskülönbséget okoz, amely az oldat koncentrációjától és a polimer molekulatömegétől függ (1) (3) (4).

Alkalmazhatóság: M_n20 000–200 000 között.

1.4. Gőzfázis ozmometria:

tiszta oldószer aeroszol párolgási sebességének összehasonlítása legalább három eltérő koncentrációban polimert tartalmazó aeroszolhoz képest (1) (5) (6).

Alkalmazhatóság: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Végcsoport analízis**

A módszer alkalmazásához a polimer általános szerkezetének és a láncot lezáró végcsoportok szerkezetének (aminek a fő váztól pl. NMR-rel vagy titrálással/származékképzéssel megkülönböztethetőnek kell lenni) ismerete szükséges. A polimerben jelen lévő végcsoportok molekulakoncentrációjának meghatározása a molekulatömeg értékéhez vezethet (7) (8) (9).

Alkalmazhatóság: M_n50 000-ig (csökkenő megbízhatósággal).

3. **Irodalomjegyzék**

(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. Copper ed., J. Wiley and Sons, pp. 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 Weighs, Part I, P. E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

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

▼B

A.19. POLIMEREK KIS MOLEKULATÖMEG-TARTALMA

1. MÓDSZER

Ez a gél permeációs kromatográfiás módszer az OECD TG 119-nek megfelelője (1996). Az alapelvek és további technikai információk az 1. hivatkozásban találhatók.

1.1. BEVEZETÉS

Mivel a polimerek tulajdonságai olyan változatosak, lehetetlen egyetlen módszert leírni, pontosan felsorolva az elválasztás és kiértékelés feltételeit, amelyek lefednek minden, a polimerek elválasztásánál előforduló eshetőséget és különlegességet. Különösen a komplexpolimer rendszereknél gyakran nem használható a gél permeációs kromatográfia (GPC). Amennyiben a GPC nem használható, a molekulatömeg más módszerekkel határozható meg (lásd a függeléket). Ilyen esetekben meg kell adni a használt módszer valamennyi részletét és igazolását.

A leírt módszer az 55672 DIN szabványon alapul (1). Ebben a DIN szabványban található részletes információ a kísérletek kivitelezéséről és az adatkiértékelésről. Amennyiben a kísérleti körülmények módosítása szükséges, a változtatásokat igazolni kell. Más szabvány is használható, ha teljes körű hivatkozással rendelkezik. A leírt módszer ismert polidiszperzitású polisztirol kalibrációs mintákat használ, és esetleg módosítani kell, hogy megfelelő legyen bizonyos polimereknél, pl. vízben oldható és hosszú láncú elágazó polimerek.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A kis molekulatömeget önkényesen 1 000 dalton alattiként definiálták.

Az M_n számátlag molekulatömeget és az M_w tömegátlag molekulatömeget a következő egyenletekkel lehet meghatározni:

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

ahol:

H_I = a detektorjel szintje az alapvonaltól V_i retenciós térfogatra

M_i = a polimerfrakció molekulatömege V_i retenciós térfogatnál, és n az adatpontok száma.

A molekulatömeg eloszlásának szélességét, ami a rendszer diszperzitásának mértéke, az M_w/M_n arány adja meg.

▼B

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Kalibrációt kell készíteni, mert a GPC relatív módszer. Keskeny eloszlású, lineárisan felépített, ismert M_n és M_w átlagos molekulatömegű, és ismert molekulatömeg eloszlású polisztirol standardokat használnak e célra. Az ismeretlen minta molekulatömegének meghatározására a kalibrációs görbe csak akkor használható, amennyiben a minta és a standardok elválasztásának körülményei azonos módon lettek kiválasztva.

A molekulatömeg és az elúciós térfogat között meghatározott kapcsolat csak az adott kísérlet sajátos körülményei között érvényes. A körülmények magukban foglalják mindenek felett a hőmérsékletet, az oldószert (vagy oldószerkeveréket), a kromatográfiás feltételeket és az elválasztó oszlopot vagy oszlopokat.

A minta így meghatározott molekulatömegei relatív értékek és „polisztirol ekvivalens molekulatömeg”-ként írták le őket. Ez azt jelenti, hogy a minta és a standard szerkezeti és kémiai különbségeitől függően a molekulatömegek kisebb-nagyobb mértékben eltérhetnek az abszolút értéktől. Amennyiben más standardokat használtak, pl. polietilén-glikol, polietilén-oxid, polimetil-metakrilát, poliakrilsav, azt meg kell indokolni.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A minta molekulatömeg-eloszlása és az átlagos molekulatömegek (M_n, M_w) GPC-vel meghatározhatók. A GPC a folyékony kromatográfia speciális típusa, aminél a minta az egyes alkotók hidrodinamikai térfogata szerint választódik el (2).

Az elválasztás a minta porózus anyaggal, tipikusan szerves géllel töltött oszlopon való áthaladásakor valósul meg. Kis molekulák be tudnak hatolni a pórusokba, a nagy molekulák nem. A nagy molekulák útja ezért rövidebb, és elsőként eluálódnak. A közepes méretű molekulák a pórusok egy részébe behatolnak, és később eluálódnak. A legkisebb, a gél pórusainál kisebb átlagos hidrodinamikai sugarú molekulák minden pórusba be tudnak hatolni. Ezek eluálódnak utoljára.

Ideális helyzetben az elválasztást teljesen a molekulafajták mérete szabja meg, de a gyakorlatban nehéz elkerülni valamely abszorpciós hatás közrehatását. A nem egyenletes oszlopfeltöltés és a holt térfogat ronthatja a helyzetet (2).

A detektálás megvalósul pl. a törésmutatóval vagy az UV-elnyeléssel, és egyszerű eloszlási görbét eredményez. Azonban ahhoz, hogy a tényleges molekulatömeg-értékeket a görbéhez lehessen rendelni, az oszlopot kalibrálni kell ismert molekulatömegű és ideális esetben nagyjából hasonló szerkezetű polimerek, pl. különböző polisztirol standardok futtatásával. Tipikusan Gauss-görbe kapható, néha a kis molekulatömeg oldalán kis farokkal eltorzítva, a függőleges tengely a különböző eluált molekulafajták tömeg szerinti mennyiségét mutatja, a vízszintes tengely a molekulatömeg logaritmusát.

▼B

A kis molekulatömeg-tartalmat ebből a görbéből származtatjuk. A számítás csak akkor lehet pontos, amennyiben az alacsony molekulatömegű fajták a polimerre, mint egészre ekvivalensen, tömeg szerinti alapon hatnak vissza.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Az elúciós térfogat reprodukálhatósága (relatív standard deviáció, RSD) 0,3 %-nál jobb kell, hogy legyen. Az analízis megkövetelt reprodukálhatóságát belső standarddal való korrekcióval kell biztosítani, amennyiben a kromatogramot az idő függvényében értékelik ki, és nem felel meg a fent említett követelménynek (1). A polidiszperzitás függ a standardok molekulatömegétől. Polisztirol standardoknál a tipikus értékek:

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

(M_p a standard molekulatömege a csúcsmaximumnál)

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **A standard polisztirol oldatok készítése**

A polisztirol standardokat óvatosan keverve oldják fel a választott eluensben. A gyártó ajánlásait számításba kell venni az oldatok készítésénél.

A választott standardok koncentrációja különböző faktoroktól függ, pl. injektált térfogat, az oldat viszkozitása, és az elemző detektor érzékenysége. A túltöltés elkerülése érdekében a maximális injektált térfogatot az oszlop hosszához kell igazítani. 30 cm × 7,8 mm-es oszlopú GPC-vel történő analitikai elválasztásoknál a jellemző injektált térfogat rendesen 40 és 100 µl között van. Nagyobb térfogat is elképzelhető, de nem lépheti túl a 250 µl-t. Az oszlop aktuális kalibrációja előtt meg kell határozni az injektált térfogat és a koncentráció optimális arányát.

1.6.2. **A mintaoldat készítése**

Elvben a mintaoldatok elkészítésére is ugyanezek a követelmények érvényesek. A mintát megfelelő oldószerben, pl. tetrahidro-furán (THF), óvatos rázással oldják fel. Semmilyen körülmények között sem szabad ultrahangos fürdőben feloldani. Amennyiben szükséges, az oldat tisztítható 0,2–2 µm-es pórusméretű membránszűrővel.

A feloldatlan részecskék jelenlétét, amik nagy molekulatömegű fajták miatt fordulhatnak elő, fel kell jegyezni a végleges jegyzőkönyvben. A feloldott részecskék tömegszázalékának meghatározására megfelelő módszert kell alkalmazni. Az oldatot 24 órán belül fel kell használni.

▼B

1.6.3. **A szennyezőanyag- és adalékanyag-tartalom korrekciója**

Rendszerint szükséges az M < 1 000 fajta tartalmának korrekciója a nem polimer fajtájú jelen lévő komponensek (pl. szennyező anyagok, és/vagy adalékanyagok) járulékára, kivéve ha a mért tartalom már < 1 %. Ezt a polimer oldat, vagy a GPC eluátum közvetlen analízisével érik el.

Amennyiben az oszlopon való áthaladás után az eluátum túl híg a további analízishez, töményíteni kell. Szükséges lehet az eluátum beszáradásig való párologtatása és újraoldása. Az eluátum töményítésének olyan körülmények között kell történnie, amelyek biztosítják, hogy az eluátumban nem történik változás. A GPC lépés utáni eluátumkezelés függ a mennyiségi meghatározás használt analitikus módszerétől.

1.6.4. **Készülék**

A GPC készülék a következő komponensekből áll:

— oldószertartály,

— gáztalanító (szükség szerint),

— pumpa,

— rezgéscsillapító (szükség szerint),

— injektáló rendszer,

— kromatográfiás oszlopok,

— detektor,

— áramlásmérő (szükség szerint),

— adatrögzítő, -feldolgozó,

— hulladéktároló.

Biztosítani kell, hogy a GPC rendszer inert legyen a használt oldószerekkel szemben (pl. THF oldószernél acélkapillárisok használata).

1.6.5. **Injektáló és oldószerszállító rendszer**

A minta oldatának meghatározott térfogatát automataadagolóval vagy kézzel töltik az oszlopra egy pontosan meghatározott zónába. Amennyiben kézzel végzik, a fecskendő dugattyújának túl gyors benyomása vagy kihúzása a megfigyelt molekulatömeg-eloszlásban változásokat okozhat. Az oldószert szállító rendszernek, amennyire csak lehet, lüktetésmentesnek kell lenni, ideálisan rezgéscsillapítót magában foglalva. Az áramlási sebesség 1 ml/perc nagyságrendű.

1.6.6. **Oszlop**

A mintától függően a polimert egy egyszerű, vagy több, sorba kötött oszlopot használva jellemeznek. Számos meghatározott tulajdonságokkal (pl. pórusméret, kizárási határérték) rendelkező porózus oszlopanyag elérhető a kereskedelemben. Az elválasztó gél vagy az oszlophossz megválasztása a minta tulajdonságaitól (pl. hidrodinamikai térfogatok, molekulatömeg-eloszlás) és az elválasztás sajátos körülményeitől, pl. oldószer, hőmérséklet és áramlási sebesség is függ (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Elméleti tányérszám**

Az elválasztásra használt oszlopot vagy oszlopkombinációt az elméleti tányérszámmal kell jellemezni. A THF eluáló oldószer esetében ez magában foglalja etil-benzol, vagy más megfelelő nem poláris oldat töltését ismert hosszúságú oszlopra. Az elméleti tányérszámot a következő egyenlet adja meg:

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

Ahol:

N = az elméleti tányérszám

V_e = az elúciós térfogat a csúcsmaximumnál

W = az alapvonal csúcsszélessége

$W_{1/2}$ = a csúcsszélesség félmagasságnál

1.6.8. **Az elválasztás hatékonysága**

Az elméleti tányérszámon kívül, ami a sávszélességet meghatározó mennyiség, az elválasztás hatékonyságának is van szerepe, amit a kalibrációs görbe meredeksége határoz meg. Egy oszlop elválasztási hatékonyságát a következő kapcsolat adja meg:

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

ahol:

$V_{e,\ Mx}$ = az M_x molekulatömegű polisztirol elúciós térfogata

$V_{e,(10.Mx)}$ = a 10-szer nagyobb molekulatömegű polisztirol elúciós térfogata

A rendszer felbontása általában így definiált:

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

ahol:

V_{e1}, V_{e2} = két polisztirol standard elúciós térfogata a csúcsmaximumnál

W_1, W_2 = az alapvonal csúcsszélességei

M_1, M_2 = a molekulatömegek a csúcsmaximumnál (10-es faktorral térjenek el).

Az oszloprendszerre az R-értéknek nagyobbnak kell lennie mint 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Oldószerek**

Minden oldószernek nagy tisztaságúnak kell lennie (THF-ből 99,5 %-os tisztaságút használnak). Az oldószertartálynak (inertgáz-atmoszférában, amennyiben szükséges) elég nagynak kell lennie az oszlop kalibrálásához és néhány mintaanalízishez. Az oldószert gáztalanítani kell, mielőtt a pumpával az oszlopra juttatják.

1.6.10. **Hőmérséklet-szabályozás**

A kritikus belső komponensek (injektáló hurok, oszlopok, detektor, csövezés) hőmérsékletét állandó és az oldószerválasztásnak megfelelő értéken kell tartani.

1.6.11. **Detektor**

A detektor célja az oszlopról eluált minta koncentrációjának mennyiségi rögzítése. A csúcsok szükségtelen szélesedésének elkerülésére a detektorcella küvettatérfogatának a lehető legkisebbnek kell lenni. Nem lehet nagyobb 10 μl-nél, kivéve a fényszórási és viszkozitásdetektoroknál. A detektálásra differenciális törésmutató mérést szokás használni. Azonban, ha a minta vagy az elúciós oldószer sajátos tulajdonságai megkövetelik, más detektortípusok is használhatók, pl. UV/látható fény, IR, viszkozitásdetektor stb.

2. **ADATOK ÉS JELENTÉS**

2.1. ADATOK

A DIN szabványra (1) kell hivatkozni a részletes értékelési követelménynél éppúgy, mint az adatgyűjtéssel és -feldolgozással kapcsolatos követelményeknél.

Minden mintánál két független kísérletet kell végezni. Külön-külön kell azokat elemezni. Minden esetben elengedhetetlen a mintával azonos körülmények között kezelt vakpróbákból származó adatokat is meghatározni.

Fontos egyértelműen jelezni, hogy a mért értékek a használt standard molekulatömegével ekvivalens relatív értékek.

A retenciós térfogatok vagy a retenciós idők (lehetőleg belső standardot használva korrigáltak) meghatározása után a log M_p értékek (M_p a kalibráló standard csúcsmaximuma) lesznek ábrázolva egyikük függvényében. Molekulatömeg-dekádonként legalább két kalibrációs pont szükséges, és legalább öt mérési pont kell a teljes görbéhez, aminek le kell fedni a minta becsült molekulatömegét. A kalibrációs görbe kis molekulatömegű végpontját n-hexil-benzol, vagy más megfelelő nem poláris oldott anyag definiálja. A görbének az 1 000-nél kisebb molekulatömegeknek megfelelő részét a szennyező és adalékanyagoknak megfelelően határozták meg és korrigálták. Az elúciós görbéket általában elektronikus adatfeldolgozás útján értékelik ki. A kézi digitalizálás esetében az ASTM D 3536-91 használható (3).

▼B

Amennyiben az oszlopon visszamaradt bármilyen nem oldható polimer, molekulatömege valószínűleg nagyobb az oldható frakcióénál, és amennyiben ezt figyelmen kívül hagyják, az az alacsony molekulatömeg-tartalom túlbecsülését eredményezi. A kis molekulatömeg-tartalmú nem oldható polimer korrekciójára vonatkozó útmutatás a függelékben található.

Az eloszlási görbét táblázat vagy ábra (differenciális frekvencia vagy összegszázalék a log M függvényében) formájában kell megadni. Grafikus ábrázolásnál egy molekulatömeg-dekádnak általában kb. 4 cm szélesnek kell lennie, a csúcsmaximumnak pedig kb. 8 cm magasnak kell lenni. Integrális eloszlási görbék esetében az ordinátában a különbségnek 0 és 100 % között kb. 10 cm-esnek kell lenni.

2.2. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek az alábbi információkat kell tartalmaznia:

2.2.1. **Vizsgált anyag**

— elérhető információk a vizsgált anyagról (azonosság, adalékanyagok, szennyező anyagok),

— a mintakezelés, megfigyelések, problémák leírása.

2.2.2. **Műszerezettség**

— eluens tartály, inert gáz, az eluens gáztalanítása, az eluens összetétele, szennyezők,

— pumpa, rezgéscsillapító, injektáló rendszer,

— elválasztó oszlopok (a gyártó, az oszlop jellemzőiről minden információ, mint pórusméret, az elválasztó anyag fajtája stb., a használt oszlopok száma, hossza és elrendezése),

— az oszlop (vagy oszlopkombináció) elméleti tányérszáma, elválasztás hatékonysága (a rendszer felbontása),

— információ a csúcsok szimmetriájáról,

— oszlophőmérséklet, hőmérséklet-szabályozás módja,

— detektor (mérési elv, típus, küvettatérfogat),

— áramlásmérő, amennyiben használva lett (gyártó, mérési elv),

— adatrögzítő és -feldolgozó rendszer (hardver és szoftver).

2.2.3. **A rendszer kalibrálása**

— a kalibrációs görbék megalkotásához használt módszer részletes leírása,

▼B

— információk a módszer minőségi követelményeiről (pl. korrelációs együttható, eltérés négyzetösszege stb.),

— információk minden, a kísérleti eljárás és az adatok kiértékelése és feldolgozása során alkalmazott extrapolációról, feltételezésről és közelítésről,

— a kalibrációs görbék megalkotásához használt minden mérést dokumentálni kell egy táblázatban, amely minden kalibrációs pont esetében az alábbiakat tartalmazza:

  — a minta neve,

  — a minta gyártója,

  — az M_p, M_n, M_w, és M_w/M_n standardok jellemző értékei, ahogy azokat a gyártó rendelkezésre bocsátotta, vagy az azt követő mérésekből következnek, a meghatározási módszer részleteivel együtt,

  — injektálási térfogat és koncentráció,

  — a kalibrációhoz használt M_p érték,

  — a csúcsmaximumoknál mért elúciós térfogat vagy korrigált retenciós idő,

  — a csúcsmaximumnál számított M_p,

  — a számított M_p és a kalibrációs érték százalékos hibája.

2.2.4. **Információ a kis molekulatömegű polimertartalomról**

— az analízishez használt módszerek és a kísérletek kivitelezési módjának leírása,

— információ a teljes mintára vonatkozó kis molekulatömegű frakciók százalékos (w/w) tartalmáról,

— információ a teljes mintára vonatkozó szennyező, adalékanyagokról, és más nem polimer frakcióról, tömegszázalékban kifejezve.

2.2.5. **Kiértékelés:**

— időn alapuló kiértékelés: a megkövetelt reprodukálhatóság biztosítására használt módszerek (korrekciós módszer, belső standard stb.),

— információ arról, hogy a kiértékelés az elúciós térfogat vagy a retenciós idő alapján történt,

— információ a kiértékelés korlátairól, amennyiben nem elemeztek egy csúcsot teljesen,

— a kiegyenlítési módszerek leírása, amennyiben használva lettek,

— minta-előállítási és minta-előkezelési eljárások,

— feloldatlan részecskék jelenléte, amennyiben voltak,

▼B

— injektálási térfogat (μl) és injektálási koncentráció (mg/ml),

— az ideális GPC profiltól való eltéréshez vezető hatásokat jelző megfigyelések,

— a vizsgálati eljárások minden módosításának részletes leírása,

— a hibatartományok részletei,

— az eredmények értelmezésre vonatkozó bármely egyéb információ és megfigyelés.

3. **IRODALOMJEGYZÉK**

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

(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

Függelék

Útmutató a kis molekulatömeg-tartalom korrekciójához a nem oldható polimerfrakciók vonatkozásában

Amennyiben nem oldható polimer van jelen a mintában, tömegveszteséget okoz a GPC analízis során. A nem oldható polimer irreverzibilisen visszamarad az oszlopon vagy a mintaszűrőn, míg a minta oldható része áthalad az oszlopon. Amennyiben a polimer törésmutató növekedése (dn/dc) megbecsülhető vagy mérhető, meg lehet becsülni a minta tömegvesztését az oszlopon. Ekkor az ismert koncentrációjú standard anyagokkal való külső kalibrálás és a dn/dc használatával korrekciót alkalmaznak a refraktométer válaszának kalibrálására. Az alábbi példában poli(metil-metakrilát) (pMMA) standardot használtak.

Az akril polimerek analízisénél a külső kalibráció során ismert koncentrációjú tetrahidro-furánban oldott pMMA standardot analizálnak GPC-vel, és a kapott adatok használhatók a refraktométer-állandó megállapításához, a következő egyenlet szerint:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

ahol

K = a refraktométer-állandó (mikrovoltszekundum/ml-ben),

R = a pMMA standard válasza (mikrovoltszekundumban),

C = a pMMA standard koncentrációja (mg/ml-ben),

V = az injektált térfogat (ml-ben) és

dn/dc = a törésmutató növekedése pMMA-ra tetrahidro-furánban (ml/mg-ban).

A következő adatok tipikusak a pMMA standardra:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Az eredményül kapott K értéket ($3{,}05 \times 10^{11}$ ezután az elméleti detektorválasz kiszámítására lehet használni, amennyiben az injektált polimer 100 %-a eluálódott a detektoron.

▼B

A.20. **POLIMEREK OLDÓDÁS/EXTRAKCIÓ VISELKEDÉSE VÍZBEN**

1. **MÓDSZER**

A leírt módszer megfelel az OECD TG 120-nak (1997). Az alapelvek és további technikai információk az (1) hivatkozásban találhatók.

1.1. BEVEZETÉS

Bizonyos polimereknél, pl. emulziós polimereknél, kezdeti előkészítő munkára lehet szükség, mielőtt az alább leírt módszert használni lehetne. A módszer nem alkalmazható folyékony polimerek és a vizsgálati körülmények között vízzel reagáló polimerek esetében.

Amennyiben a módszer nem praktikus vagy nem lehetséges, az oldódási/extrakciós viselkedés más módszerekkel is vizsgálható. Ilyen esetben meg kell adni a használt módszer minden részletét és igazolását.

1.2 REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.3 A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A polimerek vizes közegben való oldódási/extrakciós viselkedése lombik módszerrel (ld. A.6 oldhatóság vízben, lombik módszer) határozható meg, az alább leírt módosításokkal.

1.4 MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.5 A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.5.1. **Berendezés**

A következő berendezés szükséges a módszerhez:

— aprítóeszköz, pl. őrlőmalom ismert méretű részecskék előállítására,

— rázókészülék, hőmérséklet-szabályozási lehetőséggel,

— membránszűrő-rendszer,

— megfelelő analitikai berendezés,

— standardizált szűrők.

1.5.2 **Mintakészítés**

Egy reprezentatív mintát először 0,125 és 0,25 mm közötti részecske méretűre kell csökkenteni megfelelő szűrőket használva. A minta stabilitásához vagy az őrlési folyamatnál szükség lehet hűtésre. Gumiszerű anyagok folyékonynitrogén-hőmérsékleten apríthatók (1).

Amennyiben a megkövetelt részecskeméret-frakció nem érhető el, a részecskeméretet annyira le kell csökkenteni, amennyire csak lehetséges, és jegyzőkönyvezni kell az eredményt. A jegyzőkönyvben fel kell tüntetni az aprított minta vizsgálat előtti tárolási módját.

▼B

1.5.3. **Eljárás**

A vizsgált anyagból három 10 g-os mintát kell bemérni egyenként, három üvegdugós edénybe, és 1 000 ml vizet kell adni mindegyikhez. Amennyiben 10 g polimer kezelése kivihetetlen, a következő legnagyobb kezelhető mennyiséget kell használni, és a víz mennyiségét ehhez kell igazítani.

Az edényeket szorosan le kell zárni és 20 °C-on felrázni. Állandó hőmérsékleten működni képes rázó- vagy keverőeszközt kell használni. 24 órás időtartam elteltével az edények tartalmát centrifugálni vagy szűrni kell, és a polimer koncentrációját a tiszta vizes fázisban megfelelő analitikai módszerrel meg kell határozni. Amennyiben a vizes fázishoz nincs megfelelő analitikai módszer, a teljes oldhatóság/extrahálhatóság megbecsülhető a szűrési maradék vagy centrifugálási csapadék száraz tömegéből.

Rendszerint szükség van egyrészt a szennyező anyagok és az adalékanyagok, másrészt a kis molekulatömegű fajták közti mennyiségi megkülönböztetésre. Gravimetriás meghatározásnál vizsgált anyag használata nélküli vakpróba elvégzése is szükséges, hogy a kísérleti eljárásból származó maradékokkal is el lehessen számolni.

A polimerek oldódási/extrakciós viselkedésének meghatározása vízben 37 °C-on 2-es és 9-es pH-nál, a 20 °C-on történő kísérlet leírása szerint végezhető. A pH-értékek alkalmas pufferek vagy megfelelő savak és bázisok, mint sósav, ecetsav, analitikai tisztaságú nátrium-, vagy kálium-hidroxid, vagy NH_3 hozzáadásával állíthatók be.

A használt analitikai módszertől függően egy vagy két vizsgálatot kell elvégezni. Amennyiben a vizes fázis polimertartalmának közvetlen analízisére megfelelő sajátos módszerek állnak rendelkezésre, egy, a fent leírtak szerinti vizsgálatnak kielégítőnek kell lenni. Amennyiben ilyen módszerek nem állnak rendelkezésre és a polimer oldódási/extrakciós viselkedésének meghatározása csak a vizes extraktum teljes szervesszéntartalmának (TOC) meghatározásával végzett közvetett analízisre korlátozott, még egy további vizsgálatot kell elvégezni. Ezt a további vizsgálatot is háromszor kell elvégezni, 10-szer kisebb polimermintákkal és az első vizsgálatban használttal azonos vízmennyiséggel.

1.5.4. **Analízis**

1.5.4.1. *Egy mintamérettel végzett vizsgálat*

A vizes fázisú polimer komponenseinek közvetlen analízisére módszerek állhatnak rendelkezésre. Alternatív lehetőségként megfontolható az oldott/extrahált polimerkomponensek közvetett analízise a teljes oldhatórész-tartalom meghatározásával és a nem polimerspecifikus komponensekre vonatkozó korrekcióval.

A vizes fázis analízise az összes polimerfajta esetében lehetséges:

vagy elegendően érzékeny módszerrel, pl.

— TOC, CO_2-ot fejlesztő perszulfát vagy dikromát feltárással, amit IR-rel vagy kémiai analízissel történő becslés követ,

▼B

— atomabszorpciós spektrometria (AAS), vagy induktív csatolású plazmaemissziós (ICP) ekvivalense szilícium- vagy fémtartalmú polimereknél,

— UV abszorpció vagy spektrofluorimetria aril polimereknél,

— LC-MS alacsony molekulatömegű mintáknál,

vagy a vizes extraktum száradásig történő vákuumpárologtatásával és a maradék spektroszkópiás (IR, UV, stb.) vagy AAS/ICP analízisével.

Amennyiben a vizes fázis ily módon történő analízise nem kivitelezhető, a vizes kivonatot vízzel nem vegyíthető szerves oldószerrel, pl. klórozott szénhidrogénnel kell extrahálni. Az oldószert ezután el kell párologtatni, és a maradékot a fentiek szerint, a megadott polimertartalomnak megfelelően kell analizálni. Bármilyen szennyezőként vagy adalékként azonosított komponenst ebben a maradékban le kell vonni a polimerre magára jellemző oldódási/extrakciós fok meghatározásának céljából.

Amennyiben ezen anyagok viszonylag nagy mennyiségben vannak jelen, szükséges lehet a maradékot például HPLC- vagy GC-analízisnek alávetni annak érdekében, hogy megkülönbözethetők legyenek a szennyezők a jelen lévő monomer és monomerszármazékfajtáktól, és így az utóbbiak valódi tartalma meghatározható legyen.

Néhány esetben elegendő lehet a szerves oldószer egyszerű száradásig történő elpárologtatása és a száraz maradék lemérése.

1.5.4.2. *Két különböző mintamérettel végzett vizsgálat*

Minden vizes extraktum TOC-ra nézve analizált.

A minta nem oldódott/nem extrahált részén gravimetriás meghatározást végeznek. Amennyiben az egyes edények tartalmának centrifugálása vagy szűrése után polimermaradékok maradnak az edény falához tapadva, az edényt a szűrlettel kell öblíteni, amíg az edény megtisztul minden látható maradéktól. Ezt követően a szűrletet újracentrifugálják, vagy szűrik. A szűrőn vagy a centrifugacsőben maradó maradékokat 40 ^{o}C-on vákuumban szárítják, és lemérik. A szárítást állandó tömeg eléréséig kell folytatni.

2. **ADATOK**

2.1. EGY MINTAMÉRETTEL VÉGZETT VIZSGÁLAT

Mind a három lombik eredményeit és az átlagértékeket is meg kell adni, és tömeg per az oldat térfogatban (tipikusan mg/l), vagy tömeg per polimerminta-tömegben (tipikusan mg/g) kell kifejezni. Továbbá a minta tömegvesztését (számítása: az oldott anyag tömege osztva a kiindulási minta tömegével) is meg kell adni. Ki kell számolni a relatív standard deviációkat (RSD). Egyedi számokat kell megadni a teljes anyagra (polimer + alapvető adalékok stb.) és csak a polimerre (azaz az ilyen adalékok levonása után).

▼B

2.2. KÉT KÜLÖNBÖZŐ MINTAMÉRETTEL VÉGZETT VIZSGÁLAT

Meg kell adni a két három párhuzamossal végzett kísérlet vizes extraktumainak egyedi TOC-értékeit és valamennyi kísérlet átlagértékét, tömeg per az oldat térfogata (tipikusan mgC/l) és tömeg per kiindulási mintatömeg (tipikusan mgC/g) egységekben is kifejezve.

Amennyiben nincs különbség a nagy és kis minta/víz arány eredményeiben, ez azt jelezheti, hogy valamennyi extrahálható komponens tényleg extrahálva lett. Ebben az esetben a közvetlen analízis általában nem szükséges.

A maradékok egyedi tömegeit meg kell adni, és a minták kiindulási tömegének százalékában kell kifejezni. Átlagokat kísérletenként kell számolni. A 100 és a talált százalék különbsége az eredeti mintában lévő oldható és extrahálható anyag százalékát képviseli.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésben az alábbi információkat kell tartalmazni:

3.1.1. **Vizsgált anyag**

— a vizsgált anyagról rendelkezésre álló információk (azonosság, adalékok, szennyezők, alacsony molekulatömegű fajok tartalma).

3.1.2. **Kísérleti körülmények**

— a használt eljárások és kísérleti körülmények leírása,

— az analitikai és detektálási módszerek leírása.

3.1.3. **Eredmények**

— oldhatósági/extrahálhatósági eredmények mg/l-ben; a különböző oldatokbeli extrakciós tesztek egyedi és átlagértékei, polimertartalom és szennyező anyagok, adalékanyagok stb. szerint bontva,

— oldhatósági/extrahálhatósági eredmények mg/polimer g-ban,

— a vizes extraktumok TOC-értékei, az oldott anyag tömege és a számolt százalékok, amennyiben mérik,

— az egyes minták pH-ja,

— információ a vakpróbaértékekről,

— irodalmi hivatkozások a vizsgált anyag kémiai instabilitásról a vizsgálati és az analitikai eljárás alatt, amennyiben szükséges,

— valamennyi, az eredmények értelmezéséhez fontos információ.

4. **IRODALOMJEGYZÉK**

DIN 5377 (1976) Zerkleinerung von Kunstofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21. **OXIDÁLÓ TULAJDONSÁGOK (FOLYADÉKOK)**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Ezzel a vizsgálati módszerrel egy folyékony anyag azon képességét mérhetjük, hogy milyen mértékben képes egy éghető anyag égésének sebességét vagy intenzitását növelni, vagy olyan keveréket képezni egy éghető anyaggal, amely spontán öngyulladásra képes, ha a két anyagot alaposan összekeverik. A módszer az oxidáló folyadékok vizsgálatára szolgáló ENSZ-módszeren (1) alapul, illetve egyenértékű azzal. Mivel azonban az A21. módszer elsősorban arra szolgál, hogy kielégítse az 1907/2006 rendelet követelményeit, csak egyetlen referenciaanyaggal kell az összehasonlítást elvégezni. Más referenciaanyagok vizsgálatára és összehasonlítására akkor lehet szükség, ha a vizsgálatok eredményeit várhatóan más célokra használják fel ([1]).

Nem kell elvégezni ezt a vizsgálatot, ha a szerkezeti képlet alapján kétségkívül megállapítható, hogy az anyag nem képes exoterm reakcióba lépni egy éghető anyaggal.

Hasznos, ha a vizsgálat elvégzése előtt rendelkezünk előzetes információkkal az anyag potenciális robbanásveszélyességi tulajdonságairól.

Nem alkalmazható a vizsgálat szilárd anyagokra, gázokra, robbanásveszélyes vagy erősen tűzveszélyes anyagokra vagy szerves peroxidokra.

Előfordulhat, hogy nem kell elvégezni ezt a vizsgálatot, ha az oxidáló folyadékok vizsgálatára szolgáló ENSZ-módszerrel (1) már megvizsgálták az anyagot, és rendelkezésre állnak ennek eredményei.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS EGYSÉGEK

„Átlagos nyomásemelkedési idő”: az a mért átlagos idő, amely alatt a vizsgált keverék nyomása a légköri nyomás felett 690 kPa-ról 2 070 kPa-ra emelkedik.

1.3. REFERENCIAANYAG

Referenciaanyagként 65 tömegszázalékos vizes salétromsav (analitikai minőségű) szükséges ([2]).

([1]) Ahogyan például az ENSZ szállítási rendeleteinek keretében.

([2]) A savat a vizsgálat előtt titrálni kell annak érdekében, hogy ellenőrizzük a koncentrációját.

▼B

Adott esetben, ha a vizsgáló előre tudja, hogy a vizsgálat eredményeit végül más célokra használhatják ([1]), célszerű lehet további referenciaanyagokat is megvizsgálni ([2]).

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgálandó folyadékot 1:1 tömegarányban összekeverjük rostos cellulózzal és nyomástartó edénybe tesszük. Ha a keverés vagy betöltés során spontán öngyulladás lép fel, nincs szükség további vizsgálatra.

Ha nem lép fel spontán öngyulladás, az egész vizsgálatot el kell végezni. A keveréket a nyomástartó edényben hevíteni kell, majd meg kell mérni, hogy átlagosan mennyi idő szükséges ahhoz, hogy a nyomás a légköri nyomás felett 690 kPa-ról 2 070 kPa-ra emelkedjen. Ezt kell azután összehasonlítani a referenciaanyag(ok) és cellulóz 1:1 arányú keverékével kapott átlagos nyomásemelkedési idővel.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Egyetlen anyagon elvégzett öt kísérletben egyik eredmény sem térhet el 30 %-nál nagyobb mértékben a számtani átlagtól. Az átlaghoz képest 30 %-nál nagyobb eltérést mutató eredményeket el kell vetni, tökéletesíteni kell a keverési és betöltési eljárást, majd meg kell ismételni a vizsgálatot.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészítés**

1.6.1.1. *Az éghető anyag*

Éghető anyagként 50–250 μm szálhosszúságú és 25 μm átlagos szálátmérőjű ([3]) száraz, rostos cellulózt kell használni. Maximum 25 mm vastag rétegben, 105 °C-on, 4 órán át, tömegállandóságig kell szárítani, majd lehűlésig, illetve felhasználásig nedvszívó anyag jelenlétében a szárítóberendezésben kell tartani. A száraz cellulóz víztartalmának a száraz tömeg ([4]) 0,5 %-a alatt kell lennie. Ennek eléréséhez szükség esetén hosszabb szárítási időt kell alkalmazni ([5]). A vizsgálat során ugyanazt a tétel cellulózt kell használni.

([1]) Ahogyan például az ENSZ szállítási rendeleteinek keretében.
([2]) Például 50 w/w %-os perklórsav és 40 w/w %-os nátrium-klorát kerül használatra az (1) hivatkozásban.
([3]) Például Whatman Column Chromatographic Cellulose Powder CF 11, katalógusszám: 4021 050.
([4]) Például Karl–Fisher titrálással ellenőrizve.
([5]) Ez a víztartalom szintén elérhető például 24 órás 105 °C-on vákuum alatt történő melegítéssel.

▼B

1.6.1.2. *A berendezés*

1.6.1.2.1. A nyomástartó edény

Szükség van egy nyomástartó edényre. Az edény henger alakú, acél nyomástartó edény, amelynek hossza 89 mm, külső átmérője pedig 60 mm (lásd az 1. ábrát). A két ellentétes oldalon sík felület van kialakítva (itt az edény keresztmetszeti mérete 50 mm-re csökken), amely megkönnyíti a kezelést, amikor becsavarják a gyújtódugót és a szellőződugót. Az edényen átmenő 20 mm átmérőjű furatot az egyik végén 19 mm mélységben kibővítik, és abba 1"-os csőmenetet (British Standard Pipe = BSP) vagy azzal egyenértékű metrikus menetet vágnak. A nyomáselvezető, amely egy oldalág, a nyomástartó edény ívelt falába van becsavarozva, 35 mm-re az edény egyik végétől, és 90 °-os szögben a megmunkált sík felülethez képest. Az erre a célra szolgáló menetes furat 12 mm mély, és 1/2"-os csőmenettel (vagy ezzel egyenértékű metrikus menettel) van ellátva az oldalág végén levő menetnek megfelelően. Ha szükséges, a gáztömörség érdekében egy inert tömítés is beilleszthető. A 6 mm átmérőjű átmenő furattal ellátott oldalág 55 mm-re nyúlik ki a nyomástartó edényből. Az oldalág végén a furat fel van bővítve, és csavarmenettel van ellátva membrános nyomásátalakító számára. Bármilyen nyomásmérő eszköz alkalmazható, feltéve hogy ellenáll a forró gázoknak vagy bomlástermékeknek, és legfeljebb 5 ms alatt képes 690–2 070 kPa nyomásemelkedést érzékelni.

A nyomástartó edénynek az oldalágtól távolabbi vége gyújtódugóval van lezárva, amelyben két elektróda van, amelyek közül az egyik szigetelve van a dugó testétől, a másik pedig azzal elektromosan érintkezik. A nyomástartó edény másik vége egy hasadótárcsával van lezárva (hasadó nyomása körülbelül 2 200 kPa), amelyet egy 20 mm-es furattal ellátott rögzítődugó tart a helyén. Szükség esetén a gáztömörség biztosítására a gyújtódugóhoz inert tömítés alkalmazható. A használat során a szerelvényt egy állványzat (2. ábra) tartja megfelelő helyzetben. Ez általában egy 235 mm × 184 mm × 6 mm méretű lágyacél alaplapból és egy 185 mm hosszúságú 70 mm × 70 mm × 4 mm-es zárt szelvényből áll.

A zárt szelvény egyik végén a két szemben levő oldalból egy-egy szakaszt kivágnak úgy, hogy két lapos lábrész jöjjön létre, amely felett 86 mm hosszúságban megmarad az érintetlen zárt szelvény. Ezeknek a lapos részeknek a végét a zárt szelvény hossztengelyéhez képest 60°-os szögben levágják és az alaplaphoz hegesztik. A zárt szelvény felső végén az egyik oldalba 22 mm széles és 46 mm mély hornyot vágnak úgy, hogy ha a nyomástartó edény szerelvényt a gyújtódugóval lefelé a zárt szelvénybe belehelyezik, az oldalág a horonyba illeszkedik. Távtartóként 30 mm széles és 6 mm vastag acéldarabot hegesztenek a zárt szakasz alul levő belső felületére. Két ellentétes oldalon egy-egy 7 mm-es füles csavar rögzíti a nyomástartó edényt a helyén. Egy-egy 12 mm széles és 6 mm vastag acélszalag van hozzáhegesztve a két lapos lábhoz a zárt szakasz alsó végénél, amely a nyomástartó edényt alulról támasztja meg.

▼B

1.6.1.2.2. A gyújtórendszer

A gyújtórendszer 25 cm hosszú, 0,6 mm átmérőjű és 3,85 ohm/m ellenállású Ni/Cr huzalból áll. A huzalt egy 5 mm átmérőjű rúd segítségével tekercs alakúra kell csavarni, és a gyújtódugóban lévő elektródákhoz kell kapcsolni. A tekercset a 3. ábrán bemutatottak valamelyikének megfelelően kell kialakítani. Az edény alja és a gyújtótekercs alja közötti távolságnak 20 mm-nek kell lennie. Ha az elektródák nem állíthatók, a gyújtóhuzalnak a tekercs és az edény alja közötti végeit kerámiaköpennyel kell szigetelni. A huzalt egy legalább 10 A-t szolgáltató állandó áramú tápegységgel kell fűteni.

1.6.2. **A vizsgálat elvégzése** ([1])

A nyomásátalakító és a fűtőrendszer felszerelése után, de még a hasadótárcsa behelyezése előtt, a berendezést úgy kell tartani, hogy a gyújtódugó alul legyen. Egy üveg főzőpohárban egy keverőbot segítségével a vizsgálandó folyadékból 2,5 g-ot össze kell keverni 2,5 g száraz cellulózzal ([2]). Biztonsági okokból a keverést úgy kell végezni, hogy a vizsgálatot végző személy és a keverék között legyen egy biztonsági védőlemez. Ha a keverék a keverés vagy betöltés során meggyullad, nincs szükség további vizsgálatokra. A keveréket kisebb adagokban és ütögetve a nyomástartó edénybe kell tölteni, vigyázva arra, hogy a keverék a gyújtótekercs körül gyűljön össze, és megfelelően érintkezzen azzal. Fontos, hogy a betöltés során a tekercs ne torzuljon, mivel ez hibás eredményekhez vezethet ([3]). Ezt követően be kell tenni a hasadótárcsát a helyére, majd szorosan be kell csavarozni a tartódugót. A megtöltött edényt a hasadótárcsával felfelé a robbantó állványra kell helyezni, amelyet egy megfelelő, fémborítású füstkamrában vagy robbantókamrában kell elhelyezni. Az áramforrást a gyújtódugó külső csatlakozóihoz kell kapcsolni, és 10 A áramot kell rákapcsolni. A keverés megkezdése és az áram bekapcsolása között nem telhet el 10 percnél hosszabb idő.

A nyomásátalakító által létrehozott jelet megfelelő rendszerrel rögzíteni kell, amely lehetővé teszi mind az eredmény kiértékelését, mind pedig a nyomás változásának folyamatos rögzítését az idő függvényében (pl. egy szalagos íróműszerhez kapcsolt tranziens íróműszer). A keveréket addig kell hevíteni, amíg a hasadótárcsa el nem törik, vagy legalább 60 másodpercig. Ha a hasadótárcsa nem törik el, meg kell várni, amíg a keverék lehűl, majd a megfelelő óvintézkedések betartásával, az esetleges nyomásnövekedésre számítva, óvatosan szét kell szerelni a berendezést. A vizsgálandó anyaggal és a referenciaanyaggal vagy referenciaanyagokkal is öt kísérletet kell végezni. Fel kell jegyezni azt az időt, amely alatt a nyomás a légköri nyomás felett 690 kPa-ról 2 070 kPa-ra emelkedik. Ki kell számítani az átlagos nyomásemelkedési időt.

Bizonyos esetekben az anyagok olyan (vagy túl magas vagy túl alacsony) nyomásemelkedést idézhetnek elő, amelyet nem az anyag oxidáló tulajdonságait jellemző kémiai reakciók okoznak. Ilyen esetekben szükség lehet arra, hogy a vizsgálatot cellulóz helyett egy inert anyaggal, pl. kovaföldde l megismételjük, és így tisztázzuk a reakció jellegét.

([1]) Az oxidálószerek cellulózzal készített keverékeit potenciálisan robbanásveszélyesnek kell tekinteni, és ennek megfelelő óvatossággal kell kezelni.

([2]) A gyakorlatban ez úgy érhető el, hogy a vizsgálandó folyadékból és a cellulózból a kísérlethez szükségesnél nagyobb mennyiségben készítjük el az 1:1 arányú keveréket, majd 5 ± 0,1 g-ot teszünk belőle a nyomástartó edénybe. A keveréket minden egyes kísérlethez frissen kell elkészíteni.

([3]) Különösen kerülni kell, hogy a tekercs egymással szomszédos menetei egymáshoz érjenek.

▼B

2. **ADATOK**

Nyomásemelkedési idő mind a vizsgálandó anyag, mind a referenciaanyag(ok) esetében. Nyomásemelkedési idő az inert anyaggal végzett vizsgálat esetén, ha ilyen is történt.

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Mind a vizsgálandó anyag, mind a referenciaanyag(ok) esetében ki kell számítani az átlagos nyomásemelkedési időt.

Ki kell számítani az átlagos nyomásemelkedési időt az inert anyaggal végzett vizsgálat esetén (ha ilyen is történt).

Az 1. táblázatban a kapott eredményekre láthatunk példát.

1. táblázat

Példák az eredményekre [a]

Anyag [b]	Átlagos nyomásemelkedési idő cellulózzal készített 1:1 arányú keverékben (ms)
Ammónium-dikromát, telített vizes oldat	20 800
Kalcium-nitrát, telített vizes oldat	6 700
Vas(III)-nitrát, telített vizes oldat	4 133
Lítium-perklorát, telített vizes oldat	1 686
Magnézium-perklorát, telített vizes oldat	777
Nikkel-nitrát, telített vizes oldat	6 250
Salétromsav, 65 %	4 767 [c]
Perklórsav, 50 %	121 [c]
Perklórsav, 55 %	59
Kálium-nitrát, 30 %-os vizes oldat	26 690
Ezüst-nitrát, telített vizes oldat	– [d]
Nátrium-klorát, 40 %-os vizes oldat	2 555 [c]
Nátrium-nitrát, 45 %-os vizes oldat	4 133
Inert anyag	
Víz: cellulóz	– [d]

[a] Az ENSZ szállítási rendszer szerinti osztályozást lásd az (1) hivatkozásban.
[b] A telített oldatokat 20 °C-on kell elkészíteni.
[c] Laboratóriumok közötti összehasonlító vizsgálatokból kapott átlagérték.
[d] Nem érte el a 2 070 kPa-os maximális nyomást.

▼B

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

— a vizsgált anyag neve, összetétele, tisztasága stb.,

— a vizsgált anyag koncentrációja,

— a cellulóz szárítására alkalmazott módszer,

— az alkalmazott cellulóz víztartalma,

— a mérések eredményei,

— az inert anyaggal kapott vizsgálatok eredményei, ha történt ilyen,

— a számított átlagos nyomásemelkedési idők,

— az ettől a módszertől való bármely eltérés és annak okai,

— az eredmények értékelése szempontjából lényeges összes egyéb információ.

3.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE ([1])

A vizsgálatok eredményeit a következők alapján kell értelmezni:

a) a vizsgált anyagból és cellulózból készített keverékben fellép-e spontán öngyulladás; és

b) a nyomásnak a légköri nyomás felett 690 kPa-ról 2 070 kPa-ra való emelkedéséhez szükséges átlagos idő összehasonlítása a referenciaanyag(ok) esetén mért értékekkel.

Oxidáló hatásúnak kell tekinteni egy folyékony anyagot, ha:

a) cellulózzal alkotott 1:1 tömegarányú keverékében spontán öngyulladás lép fel; vagy

b) cellulózzal alkotott 1:1 tömegarányú keverékében az átlagos nyomásemelkedési idő kisebb vagy egyenlő a 65 tömegszázalékos vizes salétromsav és cellulóz 1:1 tömegarányú keverékében mért-tel.

A téves pozitív eredmények elkerülése érdekében az eredmények értelmezésekor szükség esetén figyelembe kell venni a folyadék inert anyaggal történő vizsgálatakor kapott eredményeket is.

([1]) Az ENSZ szállítási rendeletek szerinti, több referenciaanyaggal mért eredmények értelmezéséhez lásd az (1) hivatkozást.

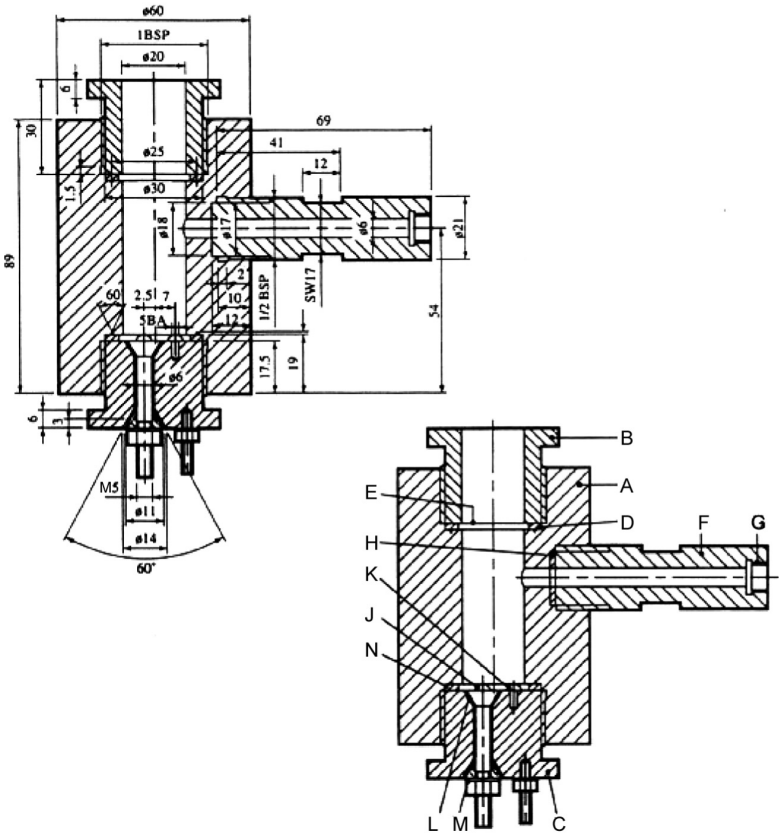
▼B

4. **HIVATKOZÁSOK**

(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, page 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

1. ábra

A nyomástartó edény



(A) A nyomástartó edény háza

(B) A hasadótárcsát tartó dugó

(C) Gyújtódugó

(D) Lágyólom alátétlemez

(E) Hasadótárcsa

(F) Oldalág

(G) Nyomásátalakító fej

(H) Alátétlemez

(J) Szigetelt elektróda

(K) Földelt elektróda

(L) Szigetelés

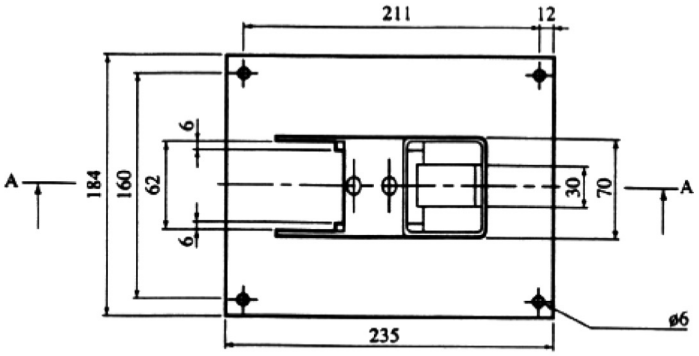
(M) Acélkúp

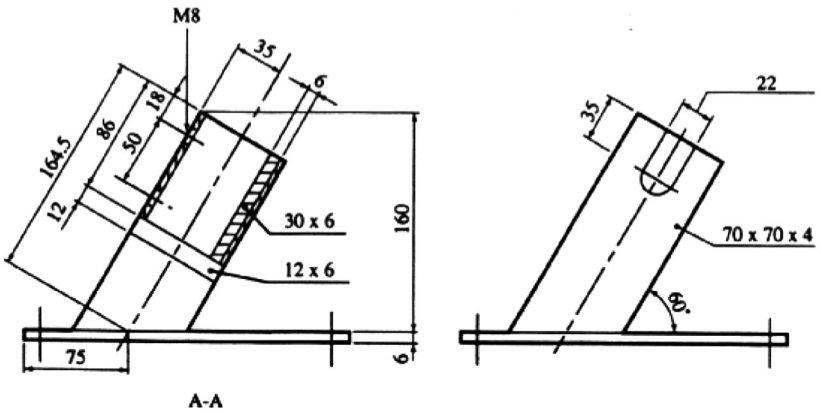
(N) Horony a tömítőgyűrű részére

▼B

2. ábra

Az állványzat

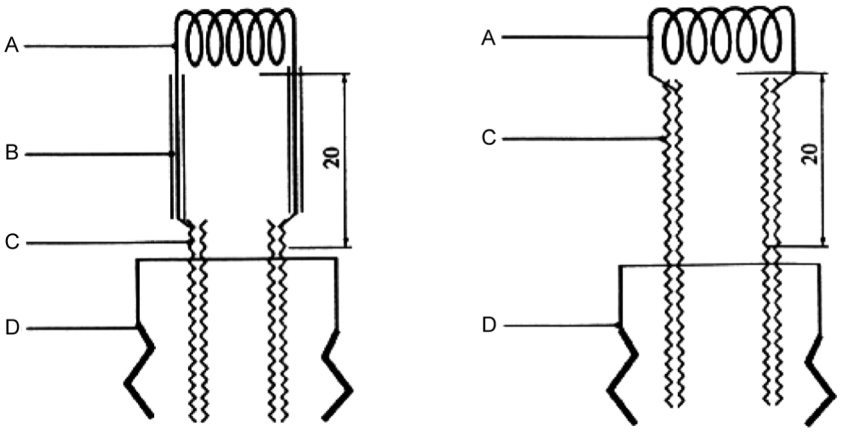




3. ábra

A gyújtórendszer

(A) Gyújtótekercs (B) Szigetelés (C) Elektródák (D) Gyújtódugó



Megjegyzés: a fenti elrendezések bármelyike alkalmazható.

▼M1

A.22. ROSTOK HOSSZAL SÚLYOZOTT ÁTLAGOS GEOMETRIAI ÁTMÉRŐJE

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

Ez a módszer a mesterséges ásványi rostok (MMMF) hosszal súlyozott átlagos geometriai átmérőjének (LWGMD) mérési módszerét írja le. Mivel a minta sokaság hosszal súlyozott átlagos geometriai átmérője 95 %-os valószínűséggel a 95 %-os konfidenciaszinteken belül lesz (LWGMD ± két standard hiba), a jelentett érték (a vizsgálati érték) a minta alsó 95 %-os konfidenciahatára lesz (azaz LWGMD – 2 két standard hiba). A módszer egy HSE ipari eljárástervezet frissítésén alapul (1994. június), melyet az ECFIA és a HSE Chester tartott megbeszélésén fogadott el, 1993. szeptember 26-án, és egy második laboratóriumközi vizsgálat részére készült, illetve abból dolgozták ki (1, 2). Ez a mérési módszer az ömlesztett anyagok vagy a mesterséges ásványi szálakat, beleértve a refraktor kerámia rostokat (RCF), mesterséges üvegszálakat (MMVF), kristályos és polikristályos szálakat tartalmazó termékek rostátmérőjének jellemzésére használható.

A hosszal történő súlyozás az anyagok mintavételezésekor vagy mozgatásakor a hosszú rostok törése által okozott átmérő eloszlásra gyakorolt hatást egyenlíti ki. Az MMMF átmérők méreteloszlásának méréséhez geometriai statisztikát (geometriai átlag) alkalmaznak, mert ezeknek az átmérőknek a méreteloszlása rendszerint a logaritmikonormális eloszláshoz közelít.

A hossz és az átmérő mérése egyaránt unalmas és időigényes, de csak ha azokat a rostokat mérik, melyek érintik a SEM látómező egy végtelenül vékony vonalát, egy adott rost kiválasztásának lehetősége arányos annak hosszával. Mivel a hosszal súlyozott számításokban ez figyelemmel van a hosszra, az egyetlen megkívánt mérés az átmérő mérése, és a LWGMD-2SE a leírtak szerint számítható.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Részecske: Olyan tárgy, melynél a hossznak a szélességhez viszonyított aránya kisebb mint 3:1.

Rost: Olyan tárgy, melynél a hossznak a szélességhez viszonyított aránya (méretarány) legalább 3:1.

1.3. ALKALMAZÁSI TERÜLET ÉS KORLÁTOK

A módszer a 0,5 μm és 6 μm közti átlagátmérőjű átmérő eloszlás vizsgálatára született. A nagyobb átmérők kisebb SEM nagyítással vizsgálhatóak, de a módszer növekvő mértékben korlátozóvá válik a finomabb rosteloszlás esetében és 0,5 μm alatti átlagátmérő esetében TEM (transzmissziós elektronmikroszkóp) mérés javasolt.

▼M1

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A rostpaplanból vagy a szabad ömlesztett rostból több reprezentatív magmintát vesznek. Az ömlesztett rostok hosszát aprítási eljárással csökkentik és a reprezentatív almintát vízben oszlatják el. Az aliquotokat kivonatolják és 0,2 μm pórusméretű, polikarbonát szűrőn átszűrik, majd előkészítik a pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) technikájú vizsgálatra. A rostátmérőket 10 000-szeres vagy nagyobb képernyőnagyítással mérik ([1]), egyenes metszés módszer alkalmazásával, az átlagátmérő torzítatlan becslése végett. A kisebb 95 % konfidenciaintervallumot (egyoldalas vizsgálaton alapulva) számítják, és az eredmény az anyag átlag geometriai rostátmérőjének legkisebb becsült értéke.

1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.5.1. **Biztonság/óvintézkedések**

A lebegő rostoknak történő személyi kitettséget minimalizálni kell, és a száraz rostok mozgatásakor füstszekrényt vagy kesztyűs manipulátort kell használni. A módszerek hatékonyságának meghatározására időszakos személyi kitettség monitoringot kell végezni. Mesterséges ásványi rostok mozgatásakor a bőrirritációk csökkentésére és a kereszt-szennyeződés megelőzése érdekében eldobható kesztyűt kell viselni.

1.5.2. **Készülék / berendezés**

— Préselő és sajtoló (10 MPa előállítására képes).

— 0,2 μm pórusméretű polikarbonát kapilláris pórus szűrők (25 mm átmérő).

— 5 μm pórusméretű cellulózészter membránszűrő alátétszűrőnek.

— Üveg szűrőberendezés (vagy eldobható szűrőrendszerek) 25 mm átmérőjű szűrőkhöz (pl. Millipore üveg mikroanalízis készlet, XX10 025 00 típusú).

— Mikroorganizmusok eltávolítására 0,2 μm pórusátmérőjű szűrőn átszűrt, frissen desztillált víz.

— Katódbevonó arany vagy arany/palládium anyaggal.

— Pásztázó elektronmikroszkóp, mely 10 nm felbontású és 10 000-szeres nagyításra képes.

— Vegyes: spatulák, 24-es típusú szikepenge, csipeszek, SEM tárgylemezek, szén ragasztó vagy szén tapadó szalag, ezüst vezető.

— Ultrahangos szonda vagy asztali ultrahangos fürdő.

— Fúró mintavevő vagy dugófúró, a mesterséges ásványi szál paplanból történő magmintavételre.

([1]) Ez a nagyítási érték 3 μm rostokhoz javasolt, a 6 μm rostok esetében 5 000-szeres nagyítás megfelelőbb lehet.

▼M1

1.5.3. **A vizsgálat kivitelezése**

1.5.3.1. *Mintavétel*

Paplanok és lapok esetében egy 25 mm-es magfúróval vagy dugófúróval vesznek mintákat a keresztmetszetből. Ezek a paplanok egy rövid hosszoldalán, annak szélességében egyenlő távolságra kell, hogy elhelyezkedjenek, vagy pedig véletlenszerűen kell venni őket, amennyiben elegendő hosszú hosszdarabok áll rendelkezésre. Ugyanezt a berendezést szabad rostokból történő véletlenszerű minták vételére is lehet használni. Lehetőség szerint hat mintát kell venni, az ömlesztett anyag térbeli eltéréseinek tükrözése céljából.

A hat magmintát 50 mm átmérőjű sajtolóban, 10 MPa-on kell összetörtni. Az anyagot egy spatulával kell összekeverni, majd 10 MPa-on újra összenyomni. Ezután az anyag kikerül a sajtolóból és lezárt üvegben kerül tárolásra.

1.5.3.2. *A minta előkészítése*

Ha szükséges, a szerves kötőanyag eltávolítható a rostnak körülbelül egy órára 450 °C-os kemencébe történő helyezésével.

A mintát kúp alakúra kell formálni, majd negyedelve szétosztani (ezt porkamrában kell végezni).

Spatula segítségével adjuk a minta egy kis mennyiségét (< 0,5 g) 100 ml frissen desztillált, 0,2 μm-es membránszűrőn átszűrt vízhez (ha kielégítőnek bizonyulnak, más, alternatív ultratiszta víz forrásokat is lehet használni). 100 W teljesítményen működtetett, kavitációra beállított ultrahangos szondával alaposan oszlassuk el. (Ha nem áll rendelkezésre szonda, a következő módszert alkalmazzuk: ismételten rázzuk és invertáljuk 30 másodpercig; asztali ultrahangos fürdőben ultrahangozzuk öt percig; majd ismételten rázzuk és invertáljuk további 30 másodpercig).

Rögtön a rost szétoszlatását követően vegyünk ki több aliquotot (pl. három darab, 3, 6 és 10 ml aliquot) egy széles szájú pipetta segítségével (2–5 ml kapacitás).

Mindegyik aliquotot vákuumszűrőzzük át egy 0,2 μm polikarbonát szűrőn, melyet egy 5 μm pórusú MEC alátét szűrővel egészít ki, egy 25 mm-es hengeres tartályos, üvegszűrős tölcsérrel. Körülbelül 5 ml szűrt desztillált vizet kell a tölcsérbe helyezni, és az aliquotot lassan át kell pipettázni át a vízbe, a pipetta csúcsát a meniszkusz alatt tartva. A pipettázást követően a pipettát és a tartályt alaposan át kell öblíteni, mivel a vékony rostok hajlamosak inkább a felületen maradni.

Óvatosan távolítsuk el a szűrőt és válasszuk el az alátét szűrőtől, mielőtt egy tartályba helyeznénk szárítani.

▼M1

24-es típusú szikével a szűrt üledékből vágjunk egy negyed vagy fél szűrőrészt, ide-oda mozgó mozdulatokkal. A kivágott részt óvatosan helyezzük a SEM tárgylemezre, szén ragasztószalaggal vagy szénragasztóval rögzítve. A szűrő széleinek és a tárgylemez villamos érintkezésének javítása érdekében legalább három helyen ezüst vezetőt kell alkalmazni. Amikor a ragasztó/ezüst vezető száraz, szórással vonja be az üledék felületét körülbelül 50 nm arany/palládium bevonattal.

1.5.3.3. *SEM kalibrálása és működtetése*

1.5.3.3.1. Kalibrálás

A SEM kalibrálását legalább hetente egyszer ellenőrizni kell (ideálisan naponta egyszer), hitelesített kalibrációs ráccsal. A kalibrációt össze kell hasonlítani egy hitelesített standarddal és ha a mért érték (SEM) nincs a hitelesített érték ± 2 %-án belül, a SEM kalibrációt be kell állítani és újra kell ellenőrizni.

A SEM-nek legalább látható 0,2 μm átmérő felbontással kell rendelkeznie, valós minta mátrixot alkalmazva, 2 000-szeres nagyításon.

1.5.3.3.2. Működtetés

A SEM-et 10 000-szeres nagyításon kell működtetni ([1]), olyan körülményeket alkalmazva, melyek jó felbontást és elfogadható képet adnak lassú, például 5 másodperc per kép letapogatási sebességnél. Bár a különböző SEM-ek üzemeltetési követelményei eltérhetnek, általánosságban a legjobban látható és legjobb felbontás érdekében, viszonylag alacsony atomsúlyú anyagokkal 5–10 keV gyorsítófeszültséget kell alkalmazni kis fénypont mérettel és rövid működési távolsággal. Mivel lineáris metszést végzünk, 0^{o}-os dőlést kell alkalmazni a minimális újrafókuszáláshoz, vagy, ha az SEM-nek van eucentrikus állapota, az eucentrikus működési távolságot kell használni. Kisebb nagyítás alkalmazható, ha az anyag nem tartalmaz kis (átmérőjű) rostokat, és a rostok átmérője nagy (> 5 μm).

1.5.3.4. *Méretezés*

1.5.3.4.1. Kisebb nagyítású vizsgálat a minta értékelésére

A mintát először kis nagyítással kell vizsgálni összetapadt nagy rostok jeleit keresve, és a rostok sűrűségét vizsgálva. Túlzott tapadás esetén javasolt új minta készítése.

A statisztikai pontosság érdekében fontos egy minimum számú rost mérése, és kívánatos a magas rostsűrűség, mivel az üres mezők vizsgálata időigényes és nem segíti az elemzést. Ugyanakkor, ha a szűrő túltöltött, nehézkes az összes mérhető rost mérése, mert a kis rostokat eltakarhatják a nagyobbak, ezért ezek esetleg figyelmen kívül maradnak.

([1]) A 3 μm rostok esetében lásd az előző jegyzetet.

▼M1

Az LWGMD túlbecslése annak eredménye lehet, ha a lineáris átlón a rostsűrűség meghaladja milliméterenként a 150 rostot. Másrészről az alacsony rostkoncentrációk növelik az elemzés idejét, és gyakran költséghatékonyabb az optimálishoz közeli rostsűrűségű minta készítése, mint az alacsony koncentrációjú szűrők számolgatásához ragaszkodás. Az optimális rostsűrűség esetén 5 0000-szeres nagyításnál egy látómezőben átlag egy vagy két megszámlálható rost található. Ugyanakkor az optimum sűrűség függ a rostok méretétől (átmérő), ezért fontos, hogy a műveletet végző személy szakszerűen döntsön arról, hogy a rostsűrűség optimálishoz közeli-e vagy sem.

1.5.3.4.2. A rostátmérők hosszal történő súlyozása

Csak azokat a rostokat kell számolni, melyek a SEM képernyőjén lévő (végtelenül) vékony vonalat érintik (vagy keresztezik). Ebből az okból kifolyólag a képernyő közepén egy vízszintes (vagy függőleges) vonal húzódik.

Alternatívaként a képernyő közepén egyetlen pont található, és a szűrőn keresztül egy irányban zajlik a folyamatos pásztázás. Minden olyan rost átmérője, melynek méretaránya nagyobb mint 3:1, és érinti, vagy keresztezi ezt a pontot, mérésre és rögzítésre kerül.

1.5.3.4.3. Rostok méretezése

Minimum 300 rost mérése javasolt. Minden rostot csak egyszer, a képen lévő vonallal vagy ponttal kapott metszéspontban mérünk (vagy ha a rost végei takarva vannak, a metszésponthoz közel). Ha nem szokványos keresztmetszetű rostok fordulnak elő, a rost átlag átmérőjét képviselő mérést kell alkalmazni. Gondosan kell eljárni a végek meghatározásakor, illetve a rost végei közötti legrövidebb távolság mérésekor. A méretezés végezhető on-line vagy pedig a tárolt képekkel vagy fotókkal off-line. Félautomatikus képi mérési rendszerek – melyek az adatokat közvetlenül egy táblázatba töltik le – használata ajánlott, mivel ezek időt takarítanak meg, kiküszöbölik az elírási hibákat és a számítások automatikusak.

A hosszú rostok végeit kis nagyítással kell ellenőrizni, meggyőződve arról, hogy azok nem göndörödnek vissza a mérési látómezőbe és csak egyszer kerülnek mérésre.

2. **ADATOK**

2.1. EREDMÉNYEK KEZELÉSE

A rostátmérők rendszerint nem mutatnak normális eloszlást. Ugyanakkor a logtranszformáció elvégzésével a normálishoz közelítő eloszlást nyerhetünk.

Kiszámítjuk az n rostátmérők (D) természetes e alapú logaritmusa (lnD) számtani átlagát (mean lnD) és standard eltérését (SD_{lnD}):

$$\text{mean } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \quad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{mean } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

A standard hiba (SE_{lnD}) meghatározásához a standard eltérést elosztjuk a mérések számának (n) négyzetgyökével.

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Az átlagból kivonjuk a standard hiba kétszeresét, és kiszámítjuk az érték (mínusz két standardhiba) exponenciálisát, így megkapjuk a geometriai átlag mínusz két standard hiba értéket.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mean } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek legalább a következő információt kell tartalmaznia:

— Az LWGMD-2SE értéke.

— Bármilyen eltérés és különösen azok, melyek hatással lehetnek az eredmények precízségére vagy pontosságára, megfelelő indoklással.

4. **HIVATKOZÁSOK**

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. MEGOSZLÁSI HÁNYADOS (1-OKTANOL/VÍZ): LASSÚ KEVERÉSES MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 123. vizsgálati iránymutatásában (2006) leírt módszerrel. A lassú keveréses módszert sikerrel alkalmazták az 1-oktanol/víz megoszlási hányados (P_{OW}) pontos meghatározására log P_{OW} = 8,2 értékig (1). Ez a kísérleti megközelítés éppen ezért alkalmas az erősen hidrofób anyagok P_{OW} értékének közvetlen meghatározására.

2. Az 1-oktanol/víz megoszlási hányados (P_{OW}) meghatározásának egyéb módszerei a lombikrázásos módszer (2), valamint a P_{OW} fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) kapott retencióból történő meghatározása (3). A lombikrázásos módszernél az oktanol-mikrocseppek vizes fázisba való átkerülése miatt fennáll a torzított mérési eredmények veszélye. Minél nagyobb a P_{OW} értéke, annál inkább előfordulhat e cseppek vizes fázisban való jelenléte miatt a vizsgált anyag vízben oldott koncentrációjának túlbecslése. Éppen ezért e módszer alkalmazása a 4-nél kisebb log P_{OW} értékű anyagokra korlátozódik. A második módszer közvetlen módon meghatározott, konkrét P_{OW}-adatokat használ a HPLC technikával megállapított retenciós viselkedés és a mért P_{OW} értékek közötti összefüggés kalibrálással való meghatározásához. Az ionizálható anyagok 1-oktanol/víz megoszlási hányadosának meghatározásához állt ugyan rendelkezésre OECD-iránymutatástervezet (4), ez azonban már nem alkalmazható.

3. A jelen vizsgálati módszert Hollandiában dolgozták ki. Az itt leírt vizsgálatok precizitását egy 15 laboratórium részvételével végzett validációs körvizsgálati tanulmány keretében validálták és optimalizálták (5).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

Szignifikancia és alkalmazási terület

4. Inert szerves anyagoknál erősen szignifikáns összefüggést mutattak ki az 1-oktanol/víz megoszlási hányados (P_{OW}) és az anyag halakban történő bioakkumulációja között. Ezen túlmenően összefüggést találtak a P_{OW} és a halakra gyakorolt toxikus hatás, valamint a vegyi anyagok szilárd anyagok, például talaj és üledékek általi felvétele között. A hivatkozott irodalom (6) széles körű áttekintést nyújt ezen összefüggésekről.

5. Számos különböző összefüggést állapítottak meg az 1-oktanol/víz megoszlási hányados és az anyagok környezeti toxikológia és kémia szempontjából lényeges egyéb tulajdonságai között. Ennek következtében az 1-oktanol/víz megoszlási hányados meghatározó paraméterré vált a vegyi anyagok környezeti kockázatának értékelése, valamint a vegyi anyagok környezeti sorsának előrejelzése szempontjából.

Alkalmazási kör

6. A lassú keveréses kísérlet során feltételezhetően kisebb mértékű a mikrocseppek 1-oktanol-cseppekből való képződése a vizes fázisban. Ennek következtében nem fordul elő a vízben oldott koncentrációnak a vizsgált anyag e cseppekhez kötődő molekulái miatti túlbecslése. A lassú keveréses módszer éppen ezért különösen alkalmas az 5 vagy annál nagyobb várt log P_{OW} értékű anyagok P_{OW} értékének meghatározására, amelyeknél a lombikrázásos módszer (2) gyakran ad hibás eredményeket.

▼M4

FOGALOMMEGHATÁROZÁS ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

7. Egy adott anyag víz és lipofil oldószer (1-oktanol) közötti megoszlási hányadosa a vegyi anyag két fázis közötti egyensúlyi megoszlását írja le. A víz és 1-oktanol közötti megoszlási hányados (P_{OW}) a vizsgált anyag vízzel telített 1-oktanolban (C_O) és 1-oktanollal (C_W) telített vízben fennálló egyensúlyi koncentrációinak hányadosát jelenti.

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Koncentrációhányados lévén dimenzió nélküli szám. A legtöbb esetben 10-es alapú logaritmusként (log P_{OW}) adják meg. A P_{OW} hőmérsékletfüggő, ezért a jegyzőkönyvezett adatok között szerepelnie kell a mérési hőmérsékletnek.

A MÓDSZER ELVE

8. A megoszlási hányados meghatározásához a vizet, az 1-oktanolt és a vizsgált anyagot állandó hőmérsékleten egyensúlyba hozzuk egymással. Ezt követően meghatározzuk a vizsgált anyag koncentrációját a két fázisban.

9. Az itt javasolt lassú keveréses módszerrel csökkenthetők a lombikrázásos kísérlet során jelentkező mikrocseppképződéssel összefüggő kísérleti nehézségek. A lassú keveréses kísérlet során vizet, 1-oktanolt és vizsgált anyagot hozunk egyensúlyba egy termosztátos keverőreaktorban. A fázisok közötti anyagmozgást keveréssel gyorsítjuk. A keverés korlátozott turbulenciával jár, ami mikrocseppek képződése nélkül fokozza az 1-oktanol és a víz közötti anyagmozgást (1).

A VIZSGÁLAT ALKALMAZHATÓSÁGA

10. Mivel a vizsgált anyagtól eltérő anyagok jelenléte befolyásolhatja a vizsgált anyag aktivitási együtthatóját, a vizsgált anyagot tiszta formában kell vizsgálni. Az 1-oktanol/víz kísérlethez a kereskedelmi forgalomban kapható legnagyobb tisztaságú anyagot kell felhasználni.

11. A jelen módszer tiszta anyagokra vonatkozik, amelyeknél nem figyelhető meg disszociáció vagy asszociáció, illetve jelentős mértékű határfelületi aktivitás. A módszerrel az ilyen anyagok, valamint a keverékek 1-oktanol/víz megoszlási hányadosa határozható meg. Amennyiben a módszert keverékeknél alkalmazzuk, a megállapított 1-oktanol/víz megoszlási hányados feltételesnek tekintendő, és függ a vizsgált keverék kémiai összetételétől, valamint a vizes fázisként alkalmazott elektrolit-összetételtől. A módszer disszociáló vagy asszociáló vegyületekre is alkalmazható, ugyanakkor ez esetben további műveleteket kell elvégezni (12. bekezdés).

12. Mivel a disszociáló anyagok – például szerves savak és fenolok, szerves lúgok, valamint szerves fémvegyületek – 1-oktanol/víz megoszlása során vízben és 1-oktanolban több egyensúlyi állapot jön létre, az 1-oktanol/víz megoszlási hányados feltételes állandó, amely nagymértékben függ az elektrolit összetételétől (7) (8). Az 1-oktanol/víz megoszlási hányados meghatározásához éppen ezért a kísérlet során szabályozni és jegyzőkönyvezni kell a pH-t és az elektrolit összetételét. E megoszlási hányadosok értékelésekor szakértői megítélésre kell támaszkodni. A disszociációs állandó(k) értéke alapján alkalmas pH-értékeket kell kiválasztani úgy, hogy minden egyes ionizációs állapothoz meghatározható legyen a megoszlási hányados. A szerves fémvegyületek vizsgálatához olyan puffereket kell használni amelyekben nem képződnek komplex vegyületek (8). A kísérleti feltételeket a vizes fázisról rendelkezésre álló kémiai ismeretek (komplexképzési állandók, disszociációs állandók) figyelembevételével oly módon kell kiválasztani, hogy megbecsülhető legyen a vizsgált anyagból a vizes fázisban keletkező változatok megjelenése. Háttérelektrolit használatával minden kísérlet során azonos ionerősséget kell biztosítani.

▼M4

13. Alacsony vízoldékonysággal vagy magas P_{OW} értékkel rendelkező anyagok vizsgálata során nehézségek merülhetnek fel, mivel a vízben oldott koncentráció ez esetben olyan alacsony, hogy nehéz pontosan meghatározni. Ez a vizsgálati módszer útmutatást ad az említett probléma kezeléséhez.

INFORMÁCIÓK A VIZSGÁLT ANYAGRÓL

14. Analitikai vagy annál nagyobb tisztasági fokú kémiai reagenseket kell alkalmazni. Javasolt jelöletlen, ismert kémiai összetételű, lehetőség szerint legalább 99 %-os tisztaságú vizsgált anyagokat, vagy radioaktívan jelölt, ismert kémiai összetételű, radiokémiai tisztaságú vizsgált anyagokat használni. Rövid felezési idejű nyomjelző elem használata esetén korrekciókat kell végezni a bomlás figyelembevétele érdekében. Radioaktívan jelölt vizsgált anyag esetén az adott vegyi anyagra specifikus analitikai módszert kell alkalmazni annak érdekében, hogy a mért radioaktivitás közvetlenül a vizsgált anyaghoz kötődjön.

15. A log P_{OW} becslése kereskedelmi forgalomban kapható, a log P_{OW} becslésére szolgáló szoftverrel, vagy a két oldószerben mérhető oldékonyság hányadosa alapján végezhető el.

16. A P_{OW} meghatározására szolgáló, lassú keveréses kísérlet elvégzése előtt a vizsgált anyagról az alábbi információknak kell rendelkezésre állniuk:

a) szerkezeti képlet;

b) az anyag vízben és 1-oktanolban oldott koncentrációjának meghatározására alkalmas analitikai módszerek;

c) ionizálható anyagok esetén a disszociációs állandó(k) (112. OECD-iránymutatás (9));

d) vízoldékonyság (10);

e) abiotikus hidrolízis (11);

f) gyors biológiai lebonthatóság (12);

g) gőznyomás (13).

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Felszerelések és készülékek

17. Általános laboratóriumi felszerelések, így különösen a következők szükségesek:

— mágneses keverők és teflonbevonatú mágneses keverőrudak a vizes fázis keveréséhez,

— a vizsgált anyag várható koncentrációjának meghatározására alkalmas analitikai műszerek,

— alul csappal ellátott keverőedény. A becsült log P_{OW} értéktől és a vizsgált vegyület kimutatási határától (LOD) függően megfontolandó egy ugyanolyan geometriai kialakítású, 1 liternél nagyobb kapacitású reakcióedény használata, hogy kellő mennyiségű víz álljon rendelkezésre a kémiai extraháláshoz és elemzéshez. Ez magasabb koncentrációt eredményez a kivett vízmintában, és következésképpen megbízhatóbb analitikai meghatározást tesz lehetővé. A szükséges térfogat becsült minimális értékét, a vegyület LOD-ját és becsült log P_{OW} értékét, valamint vízoldékonyságát az 1. függelék táblázata tartalmazza. A táblázat a log P_{OW} és az oktanolban és vízben való oldhatóság hányadosa közötti, Pinsuwan és munkatársai által bemutatott összefüggésen (14) alapul:

$$\log P_{OW} = 0{,}88 \log SR + 0{,}41$$

▼M4

ahol

$SR = S_{oktanol}/S_{víz}$ (molaritásban kifejezve),

a táblázat alapjául szolgál továbbá a Lyman által a vízoldékonyság előrejelzéséhez megadott összefüggés (15) is. Az 1. függelékben szereplő egyenlettel kiszámított vízoldékonysági értékeket első közelítésnek kell tekinteni. Megjegyzendő, hogy a vizsgálatot végző személy a vízoldékonyságot bármilyen, a víztaszító képesség és az oldékonyság közötti kapcsolat ábrázolására alkalmasabbnak tekintett összefüggés alapján is megbecsülheti. Szilárd vegyületek esetén például ajánlott az oldékonyság előrejelzése során az olvadáspontot is figyelembe venni. Módosított egyenlet alkalmazása esetén meg kell bizonyosodni arról, hogy az oktanolban való oldhatóság számítására szolgáló egyenlet módosítva is érvényes. A 2. függelék tartalmazza egy körülbelül 1 liter térfogatú, kettősfalú üveg keverőedény vázlatrajzát. A 2. függelékben ábrázolt edény arányai előnyösnek bizonyultak, és eltérő méretű eszköz használata esetén is célszerű megtartani azokat,

— a lassú keveréses kísérlet során alapvető fontosságú az állandó hőmérsékletet biztosító eszköz használata.

18. Inert anyagból készült edényeket kell használni, hogy az edény felületén elhanyagolható mértékű adszorpció jelentkezzen.

A vizsgált oldatok előkészítése

19. A P_{OW} meghatározásához a kereskedelmi forgalomban kapható legnagyobb (legalább 99 %-os) tisztaságú 1-oktanolt kell használni. Ajánlott az 1-oktanolt savval, lúggal és vízzel végzett extrakció, majd pedig szárítás útján tisztítani. Az 1-oktanol ezenkívül desztillálással is tisztítható. A tisztított 1-oktanolt a vizsgált anyagok standard oldatainak elkészítésére kell felhasználni. A P_{OW} meghatározásához üveg- vagy kvarcedényben desztillált, vagy tisztítórendszerrel nyert vizet kell használni, illetve használható HPLC-tisztaságú víz is. Desztillált víz esetén 0,22 μm-es szűrővel végzett szűrés szükséges, továbbá vakmintákat is kell készíteni annak ellenőrzése érdekében, hogy a koncentrált kivonatokban nincs-e jelen a vizsgált anyagot esetlegesen befolyásoló szennyeződés. Üvegszálas szűrő használata esetén a szűrőt három órán keresztül 400 °C hőmérsékleten végzett hőkezeléssel kell tisztítani.

20. A kísérlet előtt mindkét oldószert kölcsönösen telítsük egymással úgy, hogy megfelelő méretű edényben egyensúlyi állapotba hozzuk azokat. Ez a kétfázisú rendszer két napon át tartó lassú keverésével történik.

21. Válasszuk ki a vizsgált anyag megfelelő koncentrációját, és ennek megfelelő anyagmennyiséget oldjunk fel (vízzel telített) 1-oktanolban. Az 1-oktanol/víz megoszlási hányadost híg 1-oktanolos és vizes oldatban kell meghatározni. A vizsgált anyag koncentrációja ezért az egyes fázisokban nem haladhatja meg az oldhatóság 70 %-át, és legfeljebb 0,1 mól lehet (1). A kísérlet során használt 1-oktanol-oldatok nem tartalmazhatnak lebegő, szilárd vizsgált anyagot.

22. Megfelelő mennyiségű vizsgált anyagot oldjunk fel (vízzel telített) 1-oktanolban. Ha a log P_{OW} becsült értéke 5-nél nagyobb, ügyelni kell arra, hogy a kísérlet során használt 1-oktanolos oldatok ne tartalmazzanak lebegő, szilárd vizsgált anyagot. Ennek érdekében az 5-nél nagyobb becsült log P_{OW} értékű vegyi anyagok esetében az alábbi eljárást kell alkalmazni:

— a vizsgált anyagot oldjuk fel (vízzel telített) 1-oktanolban,

▼M4

— várjuk meg, amíg az oldatból a lebegő szilárd anyag kiülepedik. Az ülepítés ideje alatt kísérjük figyelemmel a vizsgált anyag koncentrációját,

— miután az 1-oktanolos oldatban mért koncentráció megállapodik egy stabil értéken, a törzsoldatot hígítsuk megfelelő mennyiségű 1-oktanollal,

— mérjük meg a hígított törzsoldat koncentrációját. Ha a mért koncentráció összhangban van a hígítás mértékével, a hígított törzsoldat felhasználható a lassú keveréses kísérlethez.

A minták extrahálása és elemzése

23. Az anyag vizsgálatához validált analitikai módszert kell alkalmazni. A vizsgálatot végző személyeknek bizonyítaniuk kell, hogy a vízzel telített 1-oktanol, valamint az 1-oktanollal telített víz fázisban a kísérlet során mért koncentrációk az alkalmazott analitikai eljárások mennyiségi kimutatásának módszertani határértéke fölött vannak. Amennyiben extrahálási módszerek szükségesek, a vizsgált anyag vizes és 1-oktanolos fázisból történő analitikai visszanyerését a kísérlet előtt meg kell állapítani. Az analitikai jelet vakmintákkal korrigálni kell, és ügyelni kell arra, hogy az analit ne kerüljön át az egyik mintából a másikba.

24. A hidrofób vizsgált anyagok vizes fázisban fennálló meglehetősen alacsony koncentrációja miatt az elemzés előtt valószínűleg el kell végezni a vizes fázis szerves oldószerrel történő extrahálását, és az extraktumot be kell töményíteni. Ugyanezen okból csökkenteni kell az esetleges vakminták koncentrációját. Ennek érdekében magas tisztasági fokú, lehetőség szerint szermaradék-elemzésre szolgáló oldószereket kell alkalmazni. A keresztszennyeződés ezenkívül előzőleg alaposan megtisztított(például oldószerrel kimosott vagy magas hőmérsékleten hőkezelt) üvegeszközök használatával is elkerülhető.

25. A log P_{OW} becsült értéke becslési programmal vagy szakértői megítélés alapján kapható meg. Ha az érték 6-nál nagyobb, a vakmintákkal való korrekciókat és az analit áthordását szorosan figyelemmel kell kísérni. Hasonlóképpen, ha a log P_{OW} 6-nál nagyobb, a magas betöményítési tényezők elérése érdekében kötelező helyettesítő standardot alkalmazni a visszanyeréssel való korrekciókhoz. A kereskedelmi forgalomban több szoftverprogram is kapható a log P_{OW} becsléséhez, [1] például Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) és ACD log P (19). A becslési módszerek leírása a hivatkozott irodalomban olvasható (20–22).

26. A vizsgált anyag 1-oktanolban és vízben oldott mennyiségének megállapításához használt mennyiségi meghatározási határértékeket (LOQ) elfogadott módszerek alapján kell meghatározni. Általános szabályként a mennyiségi meghatározás módszerspecifikus határértéke akként a vízben vagy 1-oktanolban oldott koncentrációként határozható meg, amely 10-es jel/zaj arányt eredményez. Megfelelő extrahálási és betöményítési módszert kell kiválasztani, továbbá meg kell határozni az analitikai visszanyeréseket is. Megfelelő betöményítési tényezőt válasszunk ki annak érdekében, hogy az analitikai meghatározás eredményeként szükséges nagyságú jelet kapjunk.

[1] Ezek az információk csupán a felhasználók kényelmét szolgálják. Más, egyenértékű számítógépes programok is használhatók, amennyiben bizonyítottan képesek azonos eredmények előállítására.

▼M4

27. Az analitikai módszer paraméterei és a várt koncentrációk alapján határozzuk meg a vegyület pontos koncentrációjának megállapításához szükséges hozzávetőleges mintaméretet. Kerülendő az olyan vizes minták használata, amelyek túl kis mennyiségűek ahhoz, hogy megfelelő analitikai jelet adjanak. Kerülendő továbbá a túl nagy méretű vízminták használata, mivel ellenkező esetben túl kevés víz maradhat a minimális számú (n = 5) elemzés elvégzéséhez. Az 1. függelék az edény térfogatának, valamint a vizsgált anyag LOD értékének és oldhatóságának függvényében adja meg a minimális mintamennyiséget.

28. A vizsgált anyagok mennyiségi meghatározása az adott vegyület kalibrálási görbéivel való összehasonlítás alapján történik. Az elemzett mintákban oldott koncentrációknak a standardok koncentrációi közé kell esniük.

29. Hatnál nagyobb becsült log P_{OW} értékű vizsgált anyagok esetén az extrahálás előtt helyettesítő standardot kell a vízmintához adni, hogy a vízminták extrahálása és betöményítése során történő veszteségek észlelhetők legyenek. A visszanyeréssel való pontos korrekció érdekében a helyettesítő standardoknak a vizsgált anyagéihoz nagyon hasonló vagy azokkal azonos tulajdonságokkal kell rendelkezniük. Erre a célra lehetőség szerint a vizsgált anyagok izotóppal jelölt (stabil) (például deutériumos vagy C^{13} izotóppal jelölt) analógjait kell használni. Amennyiben jelölt stabil izotópok – azaz C^{13} vagy H^2 – használatára nincs lehetőség, a szakirodalomban közzétett megbízható adatok alapján igazolni kell, hogy a helyettesítő standard fizikai és kémiai tulajdonságai nagyon hasonlóak a vizsgált anyagéihoz. A vizes fázis folyadék-folyadék extrakciója során emulziók képződhetnek. Ez csökkenthető, ha sót adunk a mintához, és hagyjuk az emulziót egy éjszakán át ülepedni. A minták extrahálására és betöményítésére alkalmazott módszereket jegyzőkönyvezni kell.

30. Az 1-oktanolos fázisból nyert minták elemzés előtt megfelelő oldószerrel szükség szerint hígíthatók. Ezen túlmenően javasolt a helyettesítő standardok visszanyeréssel való korrekció érdekében történő alkalmazása az olyan anyagok esetén, amelyeknél a visszanyerési kísérletek tekintetében nagymértékű variáció (10 %-nál nagyobb relatív szórás) volt tapasztalható.

31. Az analitikai módszer részleteit jegyzőkönyvezni kell. Ebbe beleértendő az extrakciós módszer, a betöményítési és hígítási tényező, a műszerek paraméterei, a kalibrálási eljárás, a kalibrálási tartomány, a vizsgált anyag vízből való analitikai visszanyerése, helyettesítő standardok visszanyeréssel való korrekció céljából történő alkalmazása, a vakminták értékei, kimutatási határok és mennyiségi meghatározási határértékek.

A vizsgálat végrehajtása

Optimális 1-oktanol/víz térfogatarányok

32. A víz és az 1-oktanol térfogatának kiválasztásakor figyelembe kell venni az 1-oktanolra és vízre vonatkozó LOQ-t, a vizes mintákra alkalmazott betöményítési tényezőket, az 1-oktanolból és vízből vett minták térfogatát, valamint a várt koncentrációkat. A lassú keveréses rendszerben alkalmazott 1-oktanol térfogatát a kísérlettel összefüggő okokból úgy kell kiválasztani, hogy az 1-oktanol-réteg kellően vastag (> 0,5 cm) legyen ahhoz, hogy az 1-oktanolos fázisból annak felkavarása nélkül lehessen mintát venni.

33. A 4,5 vagy annál nagyobb log P_{OW} értékű vegyületek meghatározásához jellemzően használt fázisarány 20–50 ml 1-oktanol és 950–980 ml víz 1 literes edényben.

▼M4

Vizsgálati körülmények

34. A vizsgálat során a reakcióedényt termosztáttal szabályozzuk, hogy a hőmérséklet-ingadozás 1 °C alá csökkenjen. A vizsgálatot 25 °C-on kell elvégezni.

35. A kísérleti rendszert vagy a kísérlet sötétkamrában való elvégzésével, vagy a reakcióedény alufóliával való bevonásával védeni kell a napfénytől.

36. A kísérletet (a lehetőségekhez mérten) pormentes környezetben kell elvégezni.

37. Az 1-oktanol–víz rendszert az egyensúlyi állapot létrejöttéig keverjük. Egy lassú keveréses kísérletet, valamint a vízből és az 1-oktanolból történő, rendszeres időközönkénti mintavételt magában foglaló előkísérlettel mérjük fel az egyensúlyba hozatalhoz szükséges időt. A mintavételi időpontok között legalább öt órának kell eltelnie.

38. Minden egyes P_{OW}-meghatározást legalább három, egymástól független lassú keveréses kísérlettel kell elvégezni.

Az egyensúlyba hozatali idő meghatározása

39. Abból kell kiindulni, hogy az egyensúlyi állapot akkor jön létre, amikor az 1-oktanol/víz koncentrációs arány idő függvényében meghatározott regressziójának négy megfigyelési időpontot magában foglaló időtartam alatti meredeksége 0,05 értékű p-szint mellett nem tér el szignifikáns mértékben a nullától. A mintavétel megkezdése előtti minimális egyensúlyba hozatali idő egy nap. Általános szabályként az 5-nél kisebb becsült log P_{OW} értékű anyagok mintavételezése a második és a harmadik napon végezhető. Víztaszítóbb vegyületek esetén az egyensúlyba hozatalhoz hosszabb időre lehet szükség. Egy 8,23-nál nagyobb log P_{OW} értékű vegyület (dekaklór-bifenil) esetén 144 óra elegendőnek bizonyult az egyensúlyi állapot kialakulásához. Az egyensúly értékelése egyetlen edényből végzett ismételt mintavétellel történik.

A kísérlet megkezdése

40. A kísérlet kezdetekor a reakcióedényt töltsük meg 1-oktanollal telített vízzel. Kellő időt kell hagyni a termosztált hőmérséklet eléréséhez.

41. A kívánt mennyiségű (szükséges térfogatnyi, vízzel telített 1-oktanolban feloldott) vizsgált anyagot óvatosan töltsük a reakcióedénybe. Ez a kísérlet kritikus lépése, ugyanis kerülendő a két fázis turbulens keveredése. Éppen ezért az 1-oktanolos fázist lassan, a kísérleti edény fala mentén, a vízfelülethez közelről kell pipettával csepegtetni. Az anyag ezt követően lefolyik az üvegfal mentén, és a vizes fázis felett vékony réteget képez. Feltétlenül kerülendő az 1-oktanol közvetlenül a lombikba történő átöntése; az 1-oktanol-cseppek nem hullhatnak közvetlenül a vízbe.

42. A keverés megkezdését követően a keverési sebességet lassan növelni kell. Ha a keverőmotorok nem állíthatók be megfelelően, transzformátor alkalmazását kell megfontolni. A keverési sebességet úgy kell beállítani, hogy a víz és az 1-oktanol határfelületénél 0,5 és legfeljebb 2,5 cm közötti mélységű örvény alakuljon ki. Ha az örvény mélysége meghaladja a 2,5 cm-t, a keverési sebességet csökkenteni kell, máskülönben az 1-oktanol-cseppekből mikrocseppek képződhetnek a vizes fázisban, ami a vizsgált anyag vízben oldott koncentrációjának túlbecsléséhez vezet. A 2,5 cm mélységű örvényt eredményező keverési sebesség a validációs körvizsgálati tanulmány (5) eredményei alapján ajánlott. Ez a sebesség kompromisszumot jelent az egyensúlyi állapot gyors elérése és az 1-oktanol-mikrocseppek keletkezésének korlátozása között.

▼M4

Mintavétel és a minták kezelése

43. A keverőt a mintavétel előtt ki kell kapcsolni, és meg kell várni, amíg a folyadékok mozgása megáll. A mintavétel befejeztével a keverőt alacsony sebességen, a fent leírtaknak megfelelően indítsuk újra, majd a keverési sebességet fokozatosan növeljük.

44. A vizes fázisból való mintavétel a reakcióedény alján található üvegcsapon keresztül történik. A csapok holttérfogatából származó vizet (a 2. függelékben ábrázolt edény esetén ez körülbelül 5 ml) nem szabad felhasználni. A csapokban lévő víz nem keveredik, így nincs egyensúlyban az elegy főtömegével. A vizes minták térfogatát fel kell jegyezni, és ügyelni kell arra, hogy a fel nem használt vízben lévő vizsgált anyagot figyelembe vegyük az anyagmérleg meghatározásakor. Az elpárolgással járó veszteségeket minimalizálni kell azáltal, hogy a vizet óvatosan, a víz–1-oktanol réteg felkavarása nélkül engedjük a választótölcsérbe áramolni.

45. Az 1-oktanol mintavételezése kis mennyiségű (kb. 100 µl) aliquotnak az 1-oktanol-rétegből 100 mikroliteres színüveg-fém fecskendővel való felszívásával történik. Ügyelni kell arra, hogy ne kavarjuk fel a határfelületet. A folyadékminta térfogatát jegyezzük fel. Kis mennyiségű aliquot elegendő, mivel az 1-oktanol-mintát hígítani fogjuk.

46. Kerülendő a minta szükségtelen átöntése. A minta térfogatát éppen ezért gravimetriai módszerrel kell meghatározni. Vízminták esetén ez a vízmintának a szükséges mennyiségű oldószert már tartalmazó választótölcsérbe való gyűjtésével érhető el.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

47. A jelen vizsgálati módszer szerint a P_{OW} meghatározása érdekében három lassú keveréses kísérletet (három kísérleti egységet) végzünk azonos körülmények között a vizsgált vegyületen. Az egyensúlyi állapot létrejöttének igazolására használt regresszionak legalább négy, egymást követő időpontokban végzett C_O-/C_W-meghatározás eredményein kell alapulnia. Ez lehetővé teszi az egyes kísérleti egységek révén kapott átlagérték bizonytalanságának mércéjeként szolgáló szórásnégyzet kiszámítását.

48. A P_{OW} az egyes kísérleti egységek révén nyert adatok szórásnégyzetével jellemezhető. Ezen információk alapján számítjuk ki a P_{OW}-t az egyes kísérleti egységek eredményeinek súlyozott átlagaként. Ehhez a kísérleti egységek eredményei szórásnégyzetének reciprokát használjuk súlyozási tényezőként. Ennek eredményeként a nagy (szórásnégyzetként kifejezett) változékonyságú, tehát kisebb megbízhatóságú adatok kevésbé befolyásolják az eredményt, mint az alacsony szórásnégyzetű adatok.

49. Ezzel analóg módon kell kiszámítani a súlyozott szórást. Ez a P_{OW}-mérés ismételhetőségét jellemzi. A kis súlyozott szórás azt jelenti, hogy a P_{OW}-meghatározás egy adott laboratóriumon belüli ismételhetősége igen magas. Az adatok formális statisztikai feldolgozásának menete az alábbiakban olvasható.

▼M4

Az eredmények feldolgozása

Az egyensúlyi állapot létrejöttének igazolása

50. Minden egyes mintavételi időponthoz számítsuk ki a vizsgált anyag 1-oktanolban és vízben oldott koncentrációja hányadosának logaritmusát (log (C_o/C_w)). A kémiai egyensúly létrejöttét e logaritmus idő függvényében való ábrázolásával igazoljuk. Ha az így kapott görbén legalább négy egymást követő időpontot magában foglaló plató figyelhető meg, az egyensúlyi állapot létrejött, és a vegyület ténylegesen feloldódott az 1-oktanolban. Ellenkező esetben a vizsgálatot addig kell folytatni, amíg a görbe négy egymást követő időpont között olyan meredekséget nem ad, amely 0,05-ös p-szint mellett nem tér el szignifikánsan a 0-tól, ami arra utal, hogy a log C_o/C_w független az időtől.

A log P_{OW} kiszámítása

51. Az adott kísérleti egység log P_{OW} értékét a log C_o/C_w idő függvényében ábrázolt görbéje azon része log C_o/C_w értékeinek súlyozott átlagaként kell kiszámítani, amelynél az egyensúlyi állapot fennállását igazoltuk. A súlyozott átlagot az adatoknak a szórásnégyzet reciprokával történő súlyozásával kell kiszámítani annak érdekében, hogy az adatok végeredményre gyakorolt hatása fordítottan arányos legyen azok bizonytalanságával.

A log P_{OW} átlagértéke

52. A különböző kísérleti egységek log P_{OW} értékének átlagát az egyes kísérleti egységek eredményei átlagának az azokhoz tartozó szórásnégyzettel való súlyozásával kell kiszámítani.

A számítás a következőképpen történik:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

ahol

$\log P_{OW,i}$ = az i-edik önálló kísérleti egység log P_{OW} értéke,

$\log P_{OW,Av}$ = az egyes log P_{OW}-meghatározások súlyozott átlagértéke,

w_i = az i-edik kísérleti egység log P_{OW} értékéhez rendelt statisztikai súlyozási faktor.

A log $P_{OW,i}$ szórásnégyzetének reciprokát használjuk w_i-ként ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$)

53. A log P_{OW} átlagának hibáját az egyes kísérleti egységekben az egyensúlyi fázis során meghatározott log C_o/C_w ismételhetőségeként becsüljük meg. Ezt az értéket a log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log\ Pow,Av}$) súlyozott szórásaként fejezik ki, amely pedig a log $P_{OW,Av}$ értékhez kapcsolódó hiba mértéke. A súlyozott szórás a súlyozott szórásnégyzetből ($var_{\log\ Pow,Av}$) a következőképpen számítható ki:

$$var_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Az n a kísérleti egységek számát jelöli.

▼M4

Vizsgálati jegyzőkönyv

54. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

— közhasználatú név, kémiai elnevezés, CAS-szám, szerkezeti képlet (radioaktívan jelölt anyag használata esetén a jelölés pozíciójának feltüntetésével), valamint a vonatkozó fizikai és kémiai tulajdonságok (lásd a 17. bekezdést),

— a vizsgált anyag tisztasága (szennyeződései),

— a jelölt vegyi anyagok jelölőanyagának tisztasága és moláris aktivitása (ha szükséges),

— a log P_{ow} előzetes becslése, valamint ezen érték levezetésének módszere.

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgálatok elvégzésének időpontja,

— kísérleti hőmérséklet,

— az 1-oktanol és a víz térfogata a vizsgálat kezdetekor,

— a kivett 1-oktanol- és vízminták térfogata,

— a reakcióedényekben hátramaradó 1-oktanol és víz térfogata,

— a reakcióedény és a keverési körülmények leírása (a keverőrúd és a reakcióedény geometriai jellemzői, az örvény magassága mm-ben, valamint adott esetben a keverési sebesség),

— a vizsgált anyag meghatározásához használt analitikai módszerek és a mennyiségi meghatározás módszerspecifikus határértéke,

— mintavételi időpontok,

— a vizes fázis pH-ja és a felhasznált pufferek, ha a pH-t ionizálható molekulák miatt be kellett állítani,

— a párhuzamos mérések száma.

Eredmények:

— az alkalmazott analitikai módszerek ismételhetősége és érzékenysége,

— a vizsgált anyag 1-oktanolban és vízben meghatározott koncentrációja az idő függvényében,

— az anyagmérleg bemutatása,

— hőmérséklet és annak szórása, vagy a kísérlet során fennálló hőmérsékleti tartomány,

— a koncentrációarány regressziója az idő függvényében,

— a log $P_{ow,Av}$ átlagértéke és annak standard hibája,

— az eredmények szöveges értékelése és értelmezése,

▼M4

— példák a reprezentatív elemzés alapadataira (az összes alapadatot a helyes laboratóriumi gyakorlat [GLP] szabályainak megfelelően kell tárolni), beleértve a helyettesítő standardok visszanyerését, valamint a kalibráláshoz használt szintek számát (a kalibrációs görbe korrelációs együtthatójára vonatkozó kritériumokkal együtt), továbbá a minőségbiztosítás/minőség-ellenőrzés (QA/QC) eredményeit,

— amennyiben rendelkezésre áll: a vizsgálati eljárás validációs jelentése (a hivatkozások között feltüntetendő).

SZAKIRODALOM

(1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the 'slow-stirring' method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499-512.

(2) E melléklet A.8., Megoszlási hányados című fejezete.

(3) E melléklet A.8., Megoszlási hányados című fejezete.

(4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.

(5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

(6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

(7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

(8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.

(9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.

(10) E melléklet A.6., Oldhatóság vízben című fejezete.

(11) E melléklet C.7., Lebomlás – abiotikus lebomlás: hidrolízis a pH függvényében című fejezete.

(12) E melléklet C.4., A „gyors" biológiai lebonthatóság meghatározása című fejezetének II–VII. része (A–F. módszer).

(13) E melléklet A.4., Gőznyomás című fejezete.

(14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.

(15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.

(16) Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

(17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

(18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

(19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

(20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

(21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.

(22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼M4

1. függelék

Táblázat a különböző LOG P_{OW} értékű vizsgált anyagok vizes fázisban való kimutatásához szükséges legkisebb víztérfogatok kiszámításához

Feltételezések:

— Az egyes aliquotok maximális térfogata = a teljes térfogat 10 %-a; 5 aliquot = a teljes térfogat 50 %-a.

— A vizsgált anyagok koncentrációja = 0,7 × oldhatóság bármelyik fázisban. Alacsonyabb koncentráció esetén nagyobb térfogat szükséges.

— Az LOD meghatározásához használt térfogat = 100 ml.

— A log P_{ow}–log S_w és log P_{ow}–SR (S_{oct}/S_w) görbékkel a vizsgált anyagokra vonatkozó összefüggések elfogadhatóan megjeleníthetők.

Az S_w becslése

log P_{ow}	Egyenlet	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

Az S_{oct} becslése

log P_{ow}	Egyenlet	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**

Vizsgált anyag összes tömege (mg)	$Tömeg_{okt}/tömeg_{víz}$	$Tömeg_{H2O}$ (mg)	$Konc._{H2O}$ (mg/l)	$Tömeg_{okt}$ (mg)	$Konc._{okt}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

A térfogatok kiszámítása

A H_2O fázis egyes LOD-koncentrációk mellett szükséges minimális térfogata

$\log K_{ow}$	LOD (mikrogramm/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
LOD-hez használt térfogat (l)	0,1					

Jelmagyarázat a számításokhoz

A vizes fázis teljes térfogatának < 10 %-a 1 literes reakcióedényben.

A vizes fázis teljes térfogatának < 10 %-a 2 literes reakcióedényben.

A vizes fázis teljes térfogatának < 10 %-a 5 literes reakcióedényben.

A vizes fázis teljes térfogatának < 10 %-a 10 literes reakcióedényben.

A 10 literes reakcióedény 10 %-ánál is nagyobb.

▼M4

A vízoldékonyság és a log P_{ow} függvényében meghatározott szükséges térfogatok áttekintése

A H_2O fázis egyes LOD-koncentrációk mellett szükséges minimális térfogata (ml)

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogramm/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

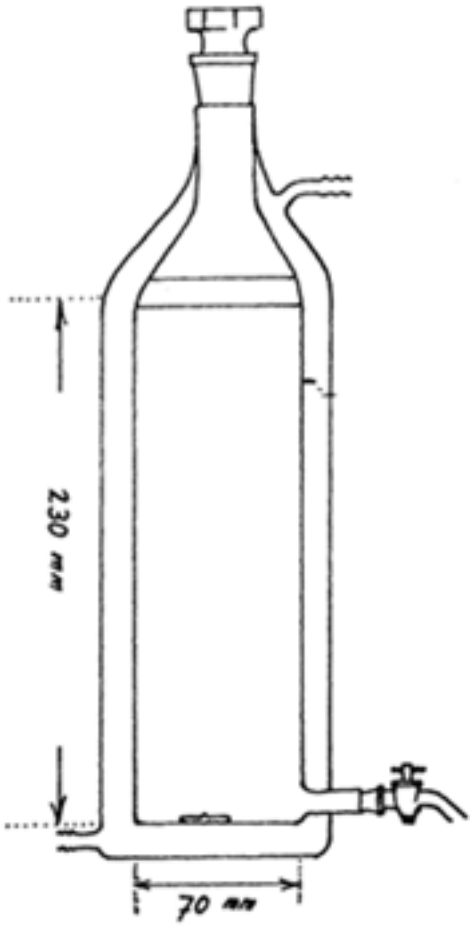
▼**M4**

$\log P_{ow}$	S_w (mg/l)	LOD (mikrogramm/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
LOD-hez használt térfogat (l)		0,1					

▼M4

2. függelék

Példa egy kettősfalú üveg reakcióedényre a P_{OW} meghatározására szolgáló lassú keveréses kísérlethez



▼M6

A.24. MEGOSZLÁSI HÁNYADOS (N-OKTANOL/VÍZ), NAGY TELJESÍTMÉNYŰ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS (HPLC) MÓDSZER

BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 117. vizsgálati iránymutatásában (2004) leírt módszerrel.

1. A megoszlási hányados (P) egy két, egymással nem elegyedő oldószerből álló, kétfázisú rendszerben feloldott anyag egyensúlyi koncentrációinak aránya. N-oktanol és víz esetében:

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{oktanol}}{C_{\text{víz}}}$$

Mivel a megoszlási hányados két koncentráció hányadosa, dimenziótlan, és rendszerint 10-es alapú logaritmusával adják meg.

2. A P_{ow} az egyik legfontosabb paraméter a vegyi anyagok környezetben bekövetkező sorsának tanulmányozása során. Erősen szignifikáns kapcsolatot mutattak ki az anyagok nem ionizált formájának P_{ow} értéke és a halakban való biológiai felhalmozódása között. Azt is kimutatták, hogy a P_{ow} hasznos paraméter a talajon és az üledékeken végbemenő adszorpció előrejelzésére, valamint kvantitatív szerkezet–hatás összefüggések megállapítására a biológiai hatások széles köre esetében.

3. Az erre a vizsgálati módszerre vonatkozó eredeti javaslat C.V. Eadsforth és P. Moser cikkén (1) alapult. A vizsgálati módszer kidolgozását és az OECD laboratóriumok közötti összehasonlító vizsgálatát a Németországi Szövetségi Köztársaság Umweltbundesamt nevű intézménye koordinálta 1986 folyamán (2).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

4. A – 2 és + 4 közötti (esetenként akár 5 és afeletti) tartományban található log P_{ow} értékeket ([1]) a lombikrázásos módszerrel (e melléklet A.8. fejezete, OECD 107. vizsgálati iránymutatás) lehet kísérleti úton meghatározni. A HPLC-módszer a 0–6 közötti tartományban található log P_{ow} értékeket fedi le (1)(2)(3)(4)(5). E módszer esetében a P_{ow} becslésére lehet szükség a megfelelő referenciaanyagok hozzárendelése, illetve a vizsgálat által generált adatokból levont következtetések alátámasztása érdekében. A számítási módszereket a vizsgálati módszer függelékében röviden bemutatjuk. A HPLC-üzemmód izokratikus.

5. A P_{ow} értékek a környezeti feltételektől függenek, például a hőmérséklettől, a pH-értéktől, az ionerősségtől stb. Ezeket a P_{ow} adatok helyes értelmezése érdekében a kísérlet során meg kell határozni. Ionizálható anyagok esetében más módszerek (pl. az ionizált anyagoknál alkalmazható pH metrikus módszerről szóló OECD-iránymutatás-tervezet (6)) is elérhetővé válhatnak, amelyeket alternatív módszerként lehet használni. Bár az említett OECD-iránymutatás-tervezet alkalmas lehet a P_{ow} meghatározására ionizálható anyagok esetében, egyes esetekben célszerűbb egy bizonyos, környezetvédelmi szempontból releváns pH-értéken (lásd a 9. pontot) a HPLC-módszert használni.

([1]) Felső határt adunk meg, mert teljes szeparációs fázist szükséges elérni a megoszlási egyensúly kiigazítása után és mielőtt mintákat veszünk ki analitikai meghatározás céljából. Ha a megfelelő gondossággal járunk el, a felső határt magasabb P_{ow} értékekre is ki lehet terjeszteni.

▼M6

A MÓDSZER ELVE

6. A fordított fázisú HPLC-t olyan, kereskedelmi forgalomban kapható szilárd fázissal megtöltött analitikai oszlopokon végezzük, amely kémiailag kovasavhoz kötött hosszú szénhidrogénláncokat (például C8, C18) tartalmaz.

7. Az ilyen oszlopra injektált vegyi anyag elválasztja a mozgó oldószer fázist a szénhidrogén álló fázistól, miközben azt a mozgó fázis végigszállítja az oszlopon keresztül. Az anyagok a szénhidrogén–víz megoszlási hányadosuk arányában maradnak vissza: a hidrofil anyagok eluálódnak először, a lipofil anyagok pedig utoljára. A retenciós időt a k kapacitástényező fejezi ki, amely a következő egyenletből adódik:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

ahol t_R a vizsgált anyag retenciós ideje, t_0 pedig a holtidő, azaz az egy oldószer-molekulának az oszlopon történő áthaladásához átlagosan szükséges idő. Kvantitatív analitikai módszerek nem szükségesek, csak a retenciós időket kell meghatározni.

8. Egy vizsgált anyag oktanol/víz megoszlási hányadosát úgy lehet kiszámítani, hogy kísérleti úton meghatározzuk a k kapacitástényezőjét, majd a kapacitástényezőt beillesztjük a következő egyenletbe:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

ahol

a, b = lineáris regressziós együtthatók.

A fenti egyenletet úgy kapjuk, hogy lineáris regressziót alkalmazunk a referenciaanyagok oktanol/víz megoszlási hányadosainak logaritmusára a referenciaanyagok kapacitástényezői logaritmusának függvényében

9. A fordított fázisú HPLC-módszer lehetővé teszi a 0 és 6 közötti log P_{ow} tartományban található megoszlási hányadosok becslését, de kivételes esetekben ki lehet terjeszteni, hogy lefedje a 6 és 10 közötti log P_{ow} tartományt is. Ehhez a mozgó fázis módosítására lehet szükség (3). A módszer nem alkalmazható erős savak és lúgok, komplex fémvegyületek, az eluenssel reakcióba lépő anyagok és felületaktív anyagok esetében. Ionizálható anyagokon nemionos formájukban (szabad sav vagy szabad bázis) csak megfelelő puffer használata mellett lehet méréseket végezni, amelynek pH-értéke szabad sav esetében a pK_a alatt, szabad bázis esetében a pK_a felett van. Emellett az ionizálható anyagok tesztelésére szolgáló pH-metrikus módszer (6) is elérhetővé válhat, és alternatív módszerként lehet majd használható (6). Ha a log P_{ow} érték környezeti veszélyességi besorolás vagy környezeti kockázatértékelés céljából kerül meghatározására, a vizsgálatot a természeti környezet szempontjából releváns, azaz az 5,0 és 9 közötti pH-tartományban kell elvégezni.

10. Egyes esetekben a szennyeződések megnehezíthetik az eredmények értelmezését a csúcsok hozzárendelésének bizonytalansága miatt. Az olyan keverékek esetében, amelyek egy feloldatlan sávot adnak, a log P_{ow} felső és alsó határát, valamint az egyes log P_{ow} csúcsok terület %-át kell meghatározni. A homológokból álló keverékek esetében a súlyozott átlagos log P_{ow} értéket is meg kell állapítani (7), amelyet az egyes P_{ow} értékek és a megfelelő terület %-értékek alapján kell kiszámítani (8). A számításban minden olyan csúcsot figyelembe kell venni, amelynek területe 5 % vagy annál nagyobb mértékben járul hozzá az összes csúcs alatti területhez (9):

▼M6

$$\log\ P_{ow}\ súlyozott\ átlaga = \frac{\sum_i(\log\ P_{owi})(terület\ \%)}{összes\ csúcs\ terület\ \% - a} = \frac{\sum(log\ P_{owi})(terület\ \%_i)}{\sum_i terület\ \%}$$

A log P_{ow} súlyozott átlaga csak homológokból (pl. alkánsorozat) álló anyagok vagy keverékek (pl. tallolajok) esetében érvényes. A keverékek esetében érdemi mérési eredményeket lehet kapni, feltéve, hogy a használt analitikai detektor a keverékben található összes anyaggal szemben azonos érzékenységet mutat, és megfelelően fel lehet őket oldani.

A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

11. Az anyag disszociációs állandóját, szerkezeti képletét és a mozgó fázisban való oldhatóságát a módszer alkalmazása előtt meg kell ismerni. Ezenkívül a hidrolízisre vonatkozó információk is hasznosak lehetnek.

MINŐSÉGI KRITÉRIUMOK

12. A mérés megbízhatóságának növelésére két meghatározást kell végezni.

— Megismételhetőség: Az azonos körülmények között elvégzett és ugyanazokat a referenciaanyagokat használó megismételt mérésekből származó log P_{ow} értékeknek a ± 0,1 log egység tartományba kell esniük.

— Reprodukálhatóság: Ha a méréseket különböző referenciaanyagokkal ismétlik meg, az eredmények eltérhetnek. A log k és log P_{ow} közötti összefüggés R korrelációs együtthatója egy adott sorozat vizsgálati anyag esetében jellemzően 0,9 körül van, amely log P_{ow} ± 0,5 log egység oktanol/víz megoszlási együtthatónak felel meg.

13. A laboratóriumok közötti összehasonlító vizsgálat kimutatta, hogy a HPLC-módszerrel a lombikrázásos értékekhez képest ± 0,5 egységen belüli log P_{ow} értékek nyerhetők (2). A szakirodalomban további összehasonlítások találhatók (4)(5)(10)(11)(12). A szerkezetileg rokon referenciaanyagokon alapuló korrelációs diagramok adják a legpontosabb eredményeket (13).

REFERENCIAANYAGOK

14. Annak érdekében, hogy egy anyag mért k kapacitástényezőjét a saját P_{ow} értékével korrelációba lehessen hozni, egy legalább 6 pontot felhasználó kalibrációs görbét kell kialakítani (lásd a 24. pontot). A felhasználó feladata a megfelelő referenciaanyagok kiválasztása. A referenciaanyagoknak általában olyan log P_{ow} értékekkel kell rendelkezniük, amelyek magukban foglalják a vizsgálati anyag log P_{ow} értékét, azaz legalább egy referenciaanyagnak a vizsgált anyagénál magasabb, egy másiknak pedig a vizsgált anyagénál alacsonyabb P_{ow} értékkel kell rendelkeznie. Extrapoláció csak kivételes esetekben alkalmazható. Célszerű, hogy ezek a referenciaanyagok a vizsgált anyaggal szerkezetileg rokon anyagok legyenek. A kalibráció során használt referenciaanyagok log P_{ow} értékeinek megbízható kísérleti adatokon kell alapulniuk. A magas (általában több mint 4) log P_{ow} értékű anyagoknál azonban számított értékek is használhatók, kivéve, ha megbízható kísérleti adatok állnak rendelkezésre. Extrapolált értékek használata esetén határértéket kell megadni.

15. Számos vegyianyag-csoport esetében a log P_{ow} értékekről terjedelmes jegyzékek állnak rendelkezésre (14)(15). Amennyiben a szerkezetileg rokon anyagok megoszlási hányadosairól nem állnak rendelkezésre adatok, más referenciaanyagokkal végzett, általánosabb kalibrálás is használható. Az ajánlott referenciaanyagok és azok P_{ow} értékei az 1. táblázatban találhatók. Ionizálható anyagok esetében a megadott értékek a nem ionizált formára vonatkoznak. Az értékek elfogadhatóságát és minőségét a laboratóriumok közötti összehasonlító vizsgálat során ellenőrizték.

▼**M6**

1. táblázat

Ajánlott referenciaanyagok

	CAS-szám	Referenciaanyag megnevezése	log P_{ow}	pKa
1	78-93-3	2-butanon (metil-etil-keton)	0,3	
2	1122-54-9	4-acetil-piridin	0,5	
3	62-53-3	Anilin	0,9	
4	103-84-4	Acetanilid	1,0	
5	100-51-6	Benzil-alkohol	1,1	
6	150-76-5	4-metoxi-fenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Fenoxi-ecetsav	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	Fenil-acetonitril	1,6	
12	589-18-4	4-metilbenzil-alkohol	1,6	
13	98-86-2	Acetofenon	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	3-nitrobenzoesav	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-klóranilin	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitro-benzol	1,9	
18	104-54-1	Fahéjalkohol (Fahéjsav-alkohol)	1,9	
19	65-85-0	Benzoesav	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-krezol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (transz)	Fahéjsav	2,1	pKa = 3,89 (cis) *4*.44 (transz)
22	100-66-3	Anizol	2,1	
23	93-58-3	Metil-benzoát	2,1	
24	71-43-2	Benzol	2,1	
25	99-04-7	3-metilbenzoesav	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-klórfenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Triklór-etilén	2,4	
28	1912-24-9	Atrazin	2,6	
29	93-89-0	Etil-benzoát	2,6	

▼**M6**

	CAS-szám	Referenciaanyag megnevezése	log P_{ow}	pKa
30	1194-65-6	2,6-diklórbenzonitril	2,6	
31	535-80-8	3-klórbenzoesav	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	Toluol	2,7	
33	90-15-3	1-naftol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-diklóranilin	2,8	
35	108-90-7	Klórbenzol	2,8	
36	1746-13-0	Allil-fenil-éter	2,9	
37	108-86-1	Brómbenzol	3,0	
38	100-41-4	Etil-benzol	3,2	
39	119-61-9	Benzofenon	3,2	
40	92-69-3	4-fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Timol	3,3	
42	106-46-7	1,4-diklór-benzol	3,4	
43	122-39-4	Difenil-amin	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftalin	3,6	
45	93-99-2	Fenil-benzoát	3,6	
46	98-82-8	Izopropilbenzol	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-triklórfenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bifenil	4,0	
49	120-51-4	Benzil-benzoát	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-szek-butilfenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-triklór-benzol	4,2	
52	143-07-7	Dodekánsav	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Difenil-éter	4,2	
54	85-01-8	Fenantrén	4,5	
55	104-51-8	n-butilbenzol	4,6	
56	103-29-7	Dibenzil	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenilpiridin	4,9	
58	206-44-0	Fluorantén	5,1	
59	603-34-9	Trifenil-amin	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

A MÓDSZER LEÍRÁSA

A megoszlási hányados előzetes becslése

16. Ha szükséges, a vizsgált anyag megoszlási hányadosát meg is lehet becsülni, lehetőleg egy számítási módszer használatával (lásd a függeléket), vagy adott esetben a vizsgált anyag tiszta oldószerekben való oldhatósági aránya segítségével.

Készülékek

17. Egy alacsony pulzálású szivattyúval és alkalmas detektáló rendszerrel felszerelt folyékony fázisú kromatográfra van szükség. A 210 nm hullámhosszot használó UV-detektor vagy az RI detektor a legkülönbözőbb kémiai csoportok esetében alkalmazható. A poláros csoportok jelenléte az álló fázisban nagymértékben ronthatja a HPLC-oszlop teljesítményét. Ezért az álló fázisnak minimális százalékban szabad csak poláros csoportokat tartalmaznia (16). Kereskedelmi forgalomban kapható mikroszemcsés, fordított fázisú töltetek vagy előre töltött oszlopok is használhatók. Az injektáló rendszer és az analitikai oszlop közé védőoszlop helyezhető el.

Mozgó fázis

18. Használjunk HPLC-minőségű metanolt és desztillált vagy ionmentesített vizet az eluáló oldószer készítésére, amelyet használat előtt gáztalanítsunk. Izokratikus elúciót célszerű alkalmazni. A metanol/víz arányt úgy állítsuk be, hogy az eluáló oldószer legalább 25 % vizet tartalmazzon. Általában a 3:1 (térfogat/térfogat) arányú metanol-víz keverék alkalmas log P = 6 anyagok 1 órán belüli eluálásához 1 ml/perc átfolyási sebesség mellett. Ha az anyag log P-je 6-nál magasabb, szükségessé válhat az elúciós idő lerövidítése (a referenciaanyagoknál is) a mobil fázis polaritásának vagy az oszlop hosszúságának csökkentésével.

19. A vizsgálati anyagnak és a referenciaanyagoknak a kimutathatósághoz elegendő koncentrációban oldhatónak kell lenniük a mozgó fázisban. Adalékok csak kivételes esetekben adhatók a metanol-víz elegyhez, mivel megváltoztatják az oszlop tulajdonságait. Ezekben az esetekben igazolni kell, hogy az adalékok nem befolyásolják a vizsgált anyag és a referenciaanyagok retenciós idejét. Ha a metanol-víz keverék nem megfelelő, más szerves oldószer-víz keverékek is használhatók, pl. etanol-víz, acetonitril-víz vagy izopropil-alkohol (2-propanol)-víz.

20. Az eluáló folyadék pH-ja döntő fontosságú ionizálható anyagok esetében. Ennek az oszlop üzemi pH-tartományán belül kell elhelyezkednie, amely rendszerint 2 és 8 között van. Ajánlatos a pufferolás. El kell kerülni a só kicsapódását és az oszlop minőségromlását, amely bizonyos szerves fázis/puffer keverékek esetében következhet be. Általában nem ajánlatos kovasav alapú álló fázisú HPLC-berendezéssel 8-as pH-érték felett méréseket végezni, mivel a lúgos mobil fázis használata gyors romlást okozhat az oszlop teljesítményében.

Oldott anyagok

21. A vizsgált anyagnak és referenciaanyagoknak kellően tisztának kell lenniük ahhoz, hogy a kromatogramon megjelenő csúcsokat hozzá lehessen rendelni a megfelelő anyagokhoz. A vizsgálatra vagy kalibrálásra szánt anyagokat, amennyiben lehetséges, a mozgó fázisban kell feloldani. A vizsgált anyag és a referenciaanyagok feloldásához a mozgó fázistól eltérő oldószer alkalmazása esetén az injektálás előtti végső hígításhoz a mozgó fázist kell használni.

Vizsgálati körülmények

22. A mérések során a hőmérsékletnek nem szabad ±1 °C-nál nagyobb értékkel változnia.

▼M6

A t_o holtidő meghatározása

23. A t_0 holtidőt kromatográffal nem késleltetett szerves anyagok (például tiokarbamid vagy formamid) alkalmazásával mérhetjük. Pontosabb holtidőt származtathatunk a mért retenciós időkből vagy egy körülbelül héttagú homológ sorból (például n-alkil-metil-ketonok) (17). A t_R (n_C + 1) retenciós időket a t_R (n_C) függvényében ábrázoljuk, ahol n_C a szénatomok száma. Egy egyenes vonalat kapunk, t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 – A)t_0, ahol A, amely a k(n_C + 1)/k(n_C) függvényt képviseli, állandó. A t_0 holtidőt az (1 – A)t_0 és az A meredekségének metszéspontjából kapjuk meg.

Regressziós egyenlet

24. A következő lépés a log k és a log P korrelációjának ábrázolása olyan megfelelő referenciaanyagok esetében, amelyek log P értékei a vizsgált anyag esetében várható log P érték közelében helyezkednek el. A gyakorlatban 6–10 referenciaanyagot injektálunk be egyidejűleg. A retenciós időket lehetőleg a detektáló rendszerhez kapcsolt regisztráló integrátoron határozzuk meg. A kapacitástényezők megfelelő logaritmusait (log k) a log P függvényében ábrázoljuk. A regressziós egyenletet rendszeres időközönként, naponta legalább egyszer határozzuk meg, azért, hogy felismerjük az esetleges változásokat az oszlop viselkedésében.

A VIZSGÁLT ANYAG P_{OW} ÉRTÉKÉNEK MEGHATÁROZÁSA

25. A vizsgálandó anyagot a legkisebb kimutatható mennyiségben fecskendezzük be. A retenciós időt kétszer határozzuk meg. A vizsgálandó anyag megoszlási hányadosa a számított kapacitástényezőnek a kalibrációs görbén történő interpolációjával kapható meg. Nagyon kicsi és nagyon nagy megoszlási hányadosok esetében extrapoláció szükséges. Ilyen esetekben különös figyelmet kell fordítani a regressziós egyenes konfidenciahatáraira. Ha a minta retenciós ideje a standardok esetében kapott retenciós idők tartományán kívül található, határértéket kell megadni.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Vizsgálati jegyzőkönyv

26. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

— ha történt ilyen, a megoszlási hányados előzetes becslését, a becsült értékeket és az alkalmazott módszert; ha számítási módszert alkalmaztunk, annak teljes leírását, beleértve az adatbázis megnevezését és a fragmentumok kiválasztására vonatkozó részletes információkat is,

— a vizsgált és a referenciaanyagokat: tisztaságukat, szerkezeti képletüket és CAS-számukat,

— a berendezések és a működési körülmények ismertetését: az analitikai oszlop, valamint a védőoszlop leírását,

— a mozgó fázist, a detektálásra szolgáló eszközöket, a hőmérsékletet, a pH-t,

— az elúciós profilokat (kromatogramok),

— a holtidőt és mérésének módját,

— a kalibrálás során használt referenciaanyagok regressziós adatait és a szakirodalomban közölt log P_{ow} értékeit,

— az illesztett regressziós egyenesre vonatkozó részleteket (a log k a log P_{ow} függvényében) és az egyenes korrelációs együtthatóját, beleértve a megbízhatósági intervallumokat is,

▼**M6**

— a vizsgált anyag átlagos retenciós adatait és interpolált log P_{ow} értékét,

— keverékek esetén: az elúciós profil kromatogramot a jelzett határértékekkel,

— a log P_{ow} csúcs terület %-ához viszonyított log P_{ow} értékeket,

— a regressziós egyenes felhasználásával készített számítást,

— a számított súlyozott átlagos log P_{ow} értékeket, ha szükséges.

IRODALOM

(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

Függelék

A P_{OW} számítási módszerei

BEVEZETÉS

1. Ez a függelék rövid bevezetést nyújt a P_{ow} számításába. További információk a tankönyvekben találhatók (1) (2).

2. A P_{ow} számított értékei használhatók:

— annak eldöntésére, hogy a kísérleti módszerek közül melyik a megfelelő: a lombikrázásos módszer – 2-től 4-ig terjedő log P_{ow} értékek esetén, illetve a HPLC-módszer 0-tól 6-ig terjedő log P_{ow} értékek esetén;

— a HPLC-eljárásokhoz megfelelő vizsgálati körülmények kiválasztásához (például referenciaanyagok, metanol/víz arány);

— a kísérleti módszerekkel kapott értékek megbízhatóságának ellenőrzésére;

— becsült érték meghatározásához, azokban az esetekben, amikor a kísérleti módszerek nem alkalmazhatók.

A számítási módszerek alapelve

3. Az itt javasolt számítási módszerek a molekulának olyan elemekre való elméleti lebomlásán alapulnak, amelyekről megbízható log P_{ow} értékek állnak rendelkezésre. A log P_{ow} a fragmentumértékek és az intramolekuláris kölcsönhatásokra vonatkozó korrekciós kifejezések összegzésével számítható ki. A fragmentumkonstansok és korrekciós kifejezések jegyzékei rendelkezésre állnak (1) (2) (3) (4) (5) (6). Néhányat közülük rendszeresen frissítenek (3).

A számított értékek megbízhatósága

4. Általánosságban elmondható, hogy a számítási módszerek megbízhatósága a vizsgált anyag összetettségének növekedésével csökken. Kis molekulasúlyú és egy vagy két funkciós csoportú, egyszerű molekulák esetében a különböző fragmentálási módszerek eredményei és a mért érték között 0,1–0,3 log P_{ow} eltérés várható. A hibahatár a használt fragmentumkonstansok megbízhatóságától, az intramolekuláris kölcsönhatások (például hidrogénkötések) felismerhetőségétől és a korrekciós kifejezések helyes használatától függ. Ionizálható vegyületek esetében figyelembe kell venni a töltést és az ionizáció mértékét (10).

A Fujita–Hansch-féle π-módszer

5. Az eredetileg Fujita és munkatársai (7) által bevezetett π hidrofób helyettesítő konstanst a következőképpen definiálták:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\,(PhX) - \log P_{ow}\,(PhH)$$

ahol PhX egy aromás származék, PhH pedig a kiindulási anyag.

$$\text{pl.}\quad ^{\pi}Cl = \log Pow\,(C6H5Cl) - \log P_{ow}\,(C6H6)$$
$$= 2{,}84 - 2{,}13$$
$$= 0{,}71$$

A π-módszer elsősorban aromás anyagokra alkalmazható. Nagy számú szubstituens π értéke áll rendelkezésre (4) (5).

A Rekker-féle módszer

6. Rekker-féle módszer szerint (8) a log P_{ow} érték kiszámítása a következőképpen történik:

$$Log\ P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{interakciós tényezők})$$

▼M6

ahol a_i egy adott fragmentum molekulában való előfordulásának száma és f_i a fragmentum log P_{ow} értékének növekménye. Az interakciós tényezők egyetlen C_m konstans (egy úgynevezett „mágikus konstans") egész számú többszöröseként fejezhetők ki. Az f_i és a C_m fragmentumkonstansokat egy 825 anyag 1 054 kísérleti P_{ow} értékét tartalmazó jegyzékből határozták meg többszörös regresszióanalízis segítségével (6) (8). A interakciós tényezők meghatározását a megadott szabályoknak megfelelően kell végezni (6) (8) (9).

A Hansch–Leo-féle módszer

7. A Hansch–Leo-féle módszer (4) szerint a log P_{ow} érték a következő összefüggésből számítható ki:

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

ahol f_i egy fragmentumkonstans, F_j egy korrekciós kifejezés (faktor), a_i és b_j pedig az ezeknek megfelelő előfordulási gyakoriság. Az atomos és csoportfragmentálási értékek jegyzékét és az F_j korrekciós kifejezések jegyzékét kísérleti P_{ow} értékekből határozták meg a fokozatos megközelítés módszerével. A korrekciós kifejezéseket több különböző osztályba sorolták be (1) (4). Olyan speciális szoftvercsomagokat fejlesztettek ki, amelyek az összes szabályt és korrekciós kifejezést figyelembe veszik (3).

ÖSSZETETT MÓDSZER

8. Az összetett molekulák log P_{ow} értékének számítása lényegesen javítható, ha a molekula olyan nagyobb szerkezeti elemekre bontható, amelyek tekintetében rendelkezésre állnak megbízható log P_{ow} értékek táblázatokból (3) (4) vagy korábban elvégzett mérésekből. Ezek a fragmentumok (például heterociklusok, antrakinon, azobenzol) ezután kombinálhatók a Hansch-féle π értékekkel, vagy a Rekker- vagy Leo-féle fragmentumkonstansokkal.

Megjegyzések

i. A számítási módszerek csak a szükséges korrekciós tényezők figyelembevételével alkalmazhatók részben vagy teljesen ionizált anyagok esetében.

ii. Amennyiben intramolekuláris hidrogénkötések létezése feltételezhető, az eredményhez hozzá kell adni a megfelelő korrekciós kifejezéseket (körülbelül +0,6 és +1,0 közötti log P_{ow} egység) (1). Az ilyen kötések jelenlétét a molekula sztereomodelljei vagy spektroszkópikus adatai jelezhetik.

iii. Amennyiben több tautomeralak lehetséges, a legvalószínűbb alakot kell használni számítási alapként.

iv. A fragmentumkonstansok jegyzékeinek módosításait gondosan figyelemmel kell kísérni.

A SZÁMÍTÁSI ÓDSZEREKKEL KAPCSOLATOS IRODALOM

(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, Kalifornia 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. DISSZOCIÁCIÓS ÁLLANDÓK A VÍZBEN (TITRÁLÁSI MÓDSZER – SPEKTROFOTOMETRIÁS MÓDSZER – KONDUKTOMETRIÁS MÓDSZER)

BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 112. vizsgálati iránymutatásában (1981) leírt módszerrel.

Előfeltételek

— Megfelelő analitikai módszer

— Vízoldékonyság

Tájékoztató jellegű információk

— Szerkezeti képlet

— Elektromos vezetőképesség a konduktometriás módszer esetében

Minősítő állítások

— Valamennyi vizsgálati módszer végrehajtható tiszta vagy kereskedelmi tisztaságú anyagokon. A szennyeződések által az eredményekre kifejtett lehetséges hatásokat figyelembe kell venni.

— A titrálási módszer nem alkalmas az alacsony vízoldékonyságú anyagok esetében (lásd alább a Vizsgálati oldatok címsor alatt).

— A spektrofotometriás módszer csak azokra az anyagokra alkalmazandó, amelyeknek észrevehetően eltér az UV/VIS abszorpciós spektruma a disszociált és a nem disszociált forma esetében. Ez a módszer alkalmas lehet az alacsony vízoldékonyságú anyagok és a nem sav–bázis disszociációk, például a komplexképződés esetében.

— Az Onsager-egyenlet érvényességi körébe tartozó esetekben a konduktometriás módszer még viszonylag alacsony koncentráció mellett, sőt nem sav–-bázis egyensúly eseteiben is alkalmazható.

Standard dokumentumok

Ez a vizsgálati módszer a „Szakirodalom” című szakaszban felsorolt hivatkozásokban megadott módszereken és a „Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification EPA” című, 1978. augusztus 18-i kiadványon alapul.

MÓDSZER – BEVEZETÉS A VIZSGÁLATBA, A VIZSGÁLAT CÉLJA, ALKALMAZÁSI KÖRE, RELEVANCIÁJA, ALKALMAZÁSA ÉS KORLÁTAI

Valamely anyag vízben történő disszociációja jelentőséggel bír a környezetre kifejtett hatásának értékelése során. A vízben történő disszociáció határozza meg az anyag formáját, amely viszont meghatározza a viselkedését és a szállítását. Befolyásolhatja a vegyi anyag talajon vagy üledéken történő adszorpcióját és a biológiai sejtekbe irányuló abszorpcióját.

Fogalommeghatározások és mértékegységek

A disszociáció a két vagy több, esetenként ionos kémiai anyaggá történő reverzibilis bomlás. A folyamatot általában a következő képlet jelöli:

$$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$$

a reakcióra irányadó koncentrációs egyensúlyi állandó pedig a következő:

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

Például abban a sajátos esetben, ha az R hidrogén (az anyag sav), az állandó:

▼M7

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

vagy

$$pK_\alpha = pH - \log\frac{[X^-]}{[HX]}$$

Referenciaanyagok

Az alábbi referenciaanyagokat az új anyagok vizsgálata során nem kell minden esetben alkalmazni. Elsősorban azért vannak megadva, hogy időnként el lehessen végezni a módszer kalibrálását, valamint azért, hogy másik módszer alkalmazása esetén lehetőséget nyújtsanak az eredmények összehasonlítására.

	pKa ([1])	Hőmérséklet °C-ban
p-nitrofenol	7,15	25 ([1])
Benzoesav	4,12	20
p-klóranilin	3,93	20

([1]) 20 °C hőmérséklethez nem áll rendelkezésre érték, de feltételezhető, hogy a mérési eredmények variabilitása nagyobb mértékű, mint a várható hőmérséklet-függőség.

Célszerű lenne több pK-értékkel rendelkező anyag alkalmazása, ahogyan az alább „A módszer elve” című részben szerepel. Ilyen anyag lehetne a következő:

Citromsav	pK_a (8)	Hőmérséklet °C-ban
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

A vizsgálati módszer elve

Az ismertetett kémiai folyamat általában csak kismértékben hőmérsékletfüggő a környezeti szempontból releváns hőmérséklet-tartományban. A disszociációs állandó meghatározása szükségessé teszi a vegyi anyag disszociált és nem disszociált formája koncentrációjának mérését. A fenti „Fogalommeghatározások és mértékegységek” című részben szereplő disszociációs reakció sztöchiometriájának ismerete alapján a megfelelő állandó meghatározható. Az e vizsgálati módszerben ismertetett konkrét esetben az anyag savként vagy bázisként viselkedik, és a disszociációs állandó meghatározása a legmegfelelőbben az anyag ionizált és nem ionizált formája relatív koncentrációjának és az oldat pH-értékének meghatározásával történik. A szóban forgó kifejezések közötti kapcsolatot a fenti „Fogalommeghatározások és mértékegységek” című részben szereplő pK_a értékhez tartozó egyenlet adja meg. Egyes anyagok esetében egynél több disszociációs állandó van és hasonló egyenletek állíthatók fel. Az itt ismertetett módszerek közül néhány a nem sav–bázis disszociációra is alkalmazható.

Minőségi kritériumok

Megismételhetőség

A disszociációs állandó mérését legalább három alkalommal meg kell ismételni, és az értékeknek ± 0,1 log egységen belül kell elhelyezkedniük.

A VIZSGÁLATI ELJÁRÁSOK LEÍRÁSA

A pK_a érték meghatározásának két alapvető megközelítése van. Az egyik az anyag ismert mennyiségének – szükség szerint – standard savval vagy bázissal történő titrálását, a másik az ionizált és a nem ionizált forma relatív koncentrációjának és pH-függőségének meghatározását foglalja magában.

▼M7

Előkészületek

Az említett elveken alapuló módszerek titrálási, spektrofotometriás és konduktometriás eljárásként sorolhatók be.

Vizsgálati oldatok

A titrálási módszer és a konduktometriás módszer esetében a vegyi anyagot desztillált vízben kell feloldani. A spektrofotometriás módszer és más módszerek esetében pufferoldatok használatosak. A vizsgálati anyag koncentrációja nem haladhatja meg a 0,01 M, illetve a telítettségi koncentráció fele közül az alacsonyabb értéket, és az oldatok elkészítésekor az anyag legtisztább rendelkezésre álló formáját kell alkalmazni. Ha az anyag csak alig oldható, a fent feltüntetett koncentrációkhoz történő hozzáadását megelőzően feloldható kis mennyiségű, vízzel elegyedő oldószerben.

Az oldatokat Tyndall-sugár segítségével meg kell vizsgálni abból a szempontból, hogy előfordulnak-e bennük emulziók, különösen akkor, ha társoldószert használtak az oldékonyság javítására. Pufferoldatok használata esetén a puffer koncentrációja nem haladhatja meg a 0,05 M-t.

Vizsgálati körülmények

Hőmérséklet

A hőmérsékletet legalább ± 1 °C-ra kell szabályozni. A meghatározást lehetőleg 20 °C-on kell elvégezni.

Ha jelentős hőmérséklet-függőség gyanúja merül fel, a meghatározást legalább két másik hőmérsékleten is el kell végezni. A hőmérsékletközöknek ebben az esetben 10 °C-nak, a hőmérséklet-szabályozásnak pedig ± 0,1 °C-nak kell lennie.

Elemzések

A módszert a vizsgált anyag jellege határozza meg. A módszernek kellően érzékenynek kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye a különböző kémiai anyagok meghatározását a vizsgálati oldat egyes koncentrációinál.

A vizsgálat végrehajtása

Titrálási módszer

A vizsgálati oldat meghatározása – szükség szerint – a standard bázikus vagy savas oldattal történő titrálással történik, melynek során a pH-értéket a titrálószer minden egyes hozzáadása után megmérik. Az egyenértékpont elérése előtt legalább 10 további hozzáadást kell végezni. Az egyensúly megfelelően gyors elérése esetén regisztráló potenciométer használható. Ehhez a módszerhez az anyag teljes mennyiségét és koncentrációját is pontosan ismerni kell. A szén-dioxid kizárása érdekében óvintézkedéseket kell tenni. Az eljárás, az óvintézkedések és a számítás részletei standard vizsgálatokban, például az (1), (2), (3), (4) hivatkozásban szerepelnek.

Spektrofotometriás módszer

Megállapítanak egy olyan hullámhosszot, ahol az anyag ionizált és nem ionizált formájának észrevehetően eltérő az extinkciós együtthatója. Az UV/VIS abszorpciós spektrumot állandó koncentrációjú oldatokból határozzák meg olyan pH-feltételek mellett, amelyeknél az anyag lényegében nem ionizált és amelyeknél teljesen ionizált, továbbá több köztes pH-érték mellett. Ez elvégezhető úgy, hogy további koncentrált savat (bázist) adnak hozzá egy, az anyagot egy többkomponensű pufferben tartalmazó, viszonylag nagy mennyiségű, kezdetben magas (alacsony) pH-értékű ((5) hivatkozás) oldathoz, vagy oly módon, hogy az anyagot például vízben, metanolban tartalmazó, ugyanolyan mennyiségű törzsoldatot adnak állandó mennyiségű, a kívánt pH-tartományt lefedő különféle pufferoldatokhoz. A kiválasztott hullámhosszon mért pH- és abszorbancia-érték alapján elegendő számú értéket kell kiszámítani a pK_a értékhez legalább öt olyan pH-értéken alapuló adatok segítségével, amelyeknél az anyag legalább 10 százalékban, de 90 százaléknál kisebb mértékben ionizált. A kísérletek további részletezése és a számítási módszer az (1) hivatkozásban szerepel.

▼M7

Konduktometriás módszer

Az anyagot tartalmazó, megközelítőleg 0,1 M koncentrációjú oldat vezetőképességét vezetőképes vízben, egy alacsony, ismert cellaállandójú cella segítségével megmérik. Ezen oldat több, pontosan elkészített hígításának vezetőképességét is megmérik. A koncentrációt minden egyes alkalommal megfelezik, és a sorozatnak a koncentráció tekintetében legalább egy nagyságrend-terjedelmet le kell fednie. Végtelen hígításnál a vezetőképesség határát nátriumsóval és extrapolálással végzett hasonló kísérlettel kell megállapítani. A disszociációfok ezt követően az egyes oldatok vezetőképessége alapján az Onsager-egyenlet segítségével számítható ki, és így az Ostwald-féle hígítási törvény segítségével a disszociációs állandó a következőképpen kapható meg: $K = \alpha^2C/(1 - \alpha)$, ahol C a mol/literben kifejezett koncentráció, α pedig a disszociált frakció. A CO_2 kizárása érdekében óvintézkedéseket kell tenni. A kísérletek további részletezése és a számítási módszer a standard szövegekben, valamint az (1), (6) és (7) hivatkozásban szerepel.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények feldolgozása

Titrálási módszer

A pK_a értéket a titrálási görbe 10 mért pontjához ki kell számítani. Az ilyen pK_a értékek átlagát és szórását ki kell számítani. A módszernek tartalmaznia kell a standard bázis vagy sav mennyiségéhez viszonyított pH görbéjét, valamint táblázatos bemutatását.

Spektrofotometriás módszerek

Az egyes spektrumok esetén kapott abszorbancia- és pH-értékeket táblázatba kell foglalni. A pK_a-ra legalább öt értéket kell kiszámítani a közbenső spektrumok adatpontjaiból, és ezen eredmények átlagát és szórását is meg kell határozni.

Konduktometriás módszer

Az ekvivalens vezetőképességet (Λ) minden egyes savkoncentrációhoz, továbbá egy savegyenérték és 0,98 egyenérték karbonátmentes nátrium-hidroxid keverékének minden egyes koncentrációjához ki kell számítani. A sav túlsúlyban van, hogy megelőzhető legyen a hidrolízis miatti OH^- túlsúly. Az 1/Λ-t Ö_C függvényében kell ábrázolni, és a só Λ_o értéke a nulla koncentrációra történő extrapolációval megtalálható.

A sav Λ_o értéke a H^+ és a Na^+ szakirodalmi értékei segítségével számítható ki. A pK_a minden egyes koncentráció esetén az $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$ és a $K_a = \alpha^2C/(1 - \alpha)$ képletből számítható ki. A K_a-ra jobb értékek kaphatók a mobilitásra és az aktivitásra tekintettel történő korrekcióval. A pK_a értékek átlagát és szórását ki kell számítani.

Vizsgálati jegyzőkönyv

Valamennyi nyers adatot és pK_a értéket, valamint a számítási módszert (az (1) hivatkozásban javasoltak szerint lehetőleg táblázatos formában) be kell mutatni, csakúgy, mint a fent ismertetett statisztikai paramétereket. A titrálási módszerek esetében részletezni kell a titrálószerek standardizálását.

A spektrofotometriás módszer esetében minden spektrumot be kell mutatni. A konduktometriás módszer esetében a cellaállandó meghatározásának részleteit dokumentálni kell. Az alkalmazott eljárásra, az analitikai módszerekre és bármely felhasznált puffer jellegére vonatkozó információkat meg kell adni.

A vizsgálati hőmérséklet(ek)et dokumentálni kell.

SZAKIRODALOM

(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 (lásd fent (4)).

(8) *Handbook of Chemistry and Physics,* 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

▼B

B. RÉSZ: MÓDSZEREK A TOXICITÁS ÉS EGYÉB EGÉSZSÉGÜGYI HATÁSOK MEGHATÁROZÁSÁRA

TARTALOMJEGYZÉK

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

B.1a. AKUT ORÁLIS TOXICITÁS – RÖGZÍTETT DÓZISÚ ELJÁRÁS

B.1b. AKUT ORÁLIS TOXICITÁS – AKUT TOXIKUS OSZTÁLY MÓDSZER

B.2. AKUT INHALÁCIÓS TOXICITÁS

B.3. AKUT TOXICITÁS (DERMÁLIS)

B.4. AKUT BŐRIRRITÁCIÓ/BŐRKORRÓZIÓ

B.5. AKUT SZEMIRRITÁCIÓ/SZEMKORRÓZIÓ

B.6. A BŐR ÉRZÉKENNYÉ TÉTELE

B.7. ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ, 28 NAPOS ORÁLIS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKON

B.8. SZUBAKUT INHALÁCIÓS TOXICITÁS: 28 NAPOS VIZSGÁLAT

B.9. ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ (28 NAPOS) TOXICITÁS (DERMÁLIS)

B.10. KROMOSZÓMA-RENDELLENESSÉGEK *IN VITRO* VIZSGÁLATA EMLŐSÖKÖN

B.11. KROMOSZÓMA-RENDELLENESSÉGEK VIZSGÁLATA EMLŐSÖK CSONTVELŐJÉBEN

B.12. EMLŐS ERITROCITA MIKRONUKLEUSZ-VIZSGÁLAT

B.13/14. MUTAGENITÁS: REVERZ MUTAGENITÁSI VIZSGÁLAT BAKTÉRIUMOKKAL

B.17. EMLŐSSEJTEKEN HPRT ÉS XPRT GÉNNEL VÉGZETT *IN VITRO* GÉNMUTÁCIÓS VIZSGÁLATOK

B.21. *IN VITRO* EMLŐSSEJT-TRANSZFORMÁCIÓS VIZSGÁLATOK

B.22. DOMINÁNS LETÁLIS VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKON

▼B

B.23.	SPERMATOGONIÁLIS KROMOSZÓMARENDELLENESSÉG VIZSGÁLATA EMLŐSÖKÖN
B.25.	EGÉREN VÉGZETT ÖRÖKLETES TRANSZLOKÁCIÓS VIZSGÁLAT
B.26.	SZUBKRÓNIKUS ORÁLIS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT, RÁGCSÁLÓKON VÉGZETT 90 NAPOS, ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ ORÁLISTOXICITÁS-VIZSGÁLAT
B.27.	SZUBKRÓNIKUSORÁLIS-TOXICITÁSI VIZSGÁLAT, 90 NAPOS, ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ ORÁLISTOXICITÁSI VIZSGÁLAT NEM RÁGCSÁLÓKON
B.28.	SZUBKRÓNIKUS DERMÁLIS TOXICITÁSVIZSGÁLAT 90 NAPOS, ISMÉTELT DERMÁLIS ADAGOLÁSÚ VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓFAJOKON
B.29.	SZUBKRÓNIKUS INHALÁCIÓS TOXICITÁS: 90 NAPOS VIZSGÁLAT
B.30.	KRÓNIKUS TOXICITÁSI VIZSGÁLATOK
B.31.	PRENATÁLIS FEJLŐDÉSI TOXICITÁSVIZSGÁLAT
B.32.	A RÁKKELTŐ HATÁS VIZSGÁLATA
B.33.	A KRÓNIKUS TOXICITÁS ÉS A RÁKKELTŐ HATÁS EGYÜTTES VIZSGÁLATA
B.34.	EGYGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS TOXICITÁSVIZSGÁLAT
B.35.	KÉTGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS TOXICITÁSVIZSGÁLAT
B.36.	TOXIKOKINETIKAI VIZSGÁLAT
B.37.	SZERVES FOSZFORVEGYÜLETEKKEL KIVÁLTOTT AKUT KÉSLELTETETT NEUROTOXICITÁS
B.38.	SZERVES FOSZFORVEGYÜLETEKKEL KIVÁLTOTT KÉSLELTETETT NEUROTOXOCITÁS-VIZSGÁLAT, 28 NAPOS ISMÉTELT ADAGOLÁS ESETÉN
B.39.	NEM ÜTEMEZETT DNS-SZINTÉZIS (UDS) *IN VIVO* VIZSGÁLAT EMLŐS MÁJSEJTEKKEL
B.40.	*IN VITRO* BŐRKORRÓZIÓ: TRANSZKUTÁN ELEKTROMOS REZISZTENCIA (TER) VIZSGÁLATI MÓDSZER
B.40 bis.	*IN VITRO* BŐRKORRÓZIÓ: REKONSTRUÁLT EMBERI FELHÁMMODELLEN VÉGZETT VIZSGÁLATI MÓDSZER
B.41.	*IN VITRO* 3T3 NRU FOTOTOXICITÁS-VIZSGÁLAT
B.42.	BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: LOKÁLIS NYIROKCSOMÓ-VIZSGÁLATI MÓDSZER

▼B

B.43. NEUROTOXICITÁSI VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKBAN

B.44. BŐRÖN ÁT TÖRTÉNŐ FELSZÍVÓDÁS: *IN VIVO* MÓDSZER

B.45. BŐRÖN ÁT TÖRTÉNŐ FELSZÍVÓDÁS: *IN VITRO* MÓDSZER

B.46. *IN VITRO* BŐRIRRITÁCIÓ: REKONSTRUÁLT EMBERI FELHÁMMODELLEN VÉGZETT VIZSGÁLATI MÓDSZER

B.47. A SZARVASMARHA-SZARUHÁRTYA OPACITÁSÁNAK ÉS PERMEABILITÁSÁNAK MÉRÉSÉN ALAPULÓ VIZSGÁLATI MÓDSZER I. A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁST OKOZÓ VEGYI ANYAGOK ÉS II. A SZEMIRRITÁCIÓ VAGY A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁS TEKINTETÉBEN BESOROLÁST NEM IGÉNYLŐ VEGYI ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA

B.48. IZOLÁLT CSIRKESZEM VIZSGÁLATÁN ALAPULÓ VIZSGÁLATI MÓDSZER I. A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁST OKOZÓ VEGYI ANYAGOK ÉS II. A SZEMIRRITÁCIÓ VAGY A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁS TEKINTETÉBEN BESOROLÁST NEM IGÉNYLŐ VEGYI ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA

B.49. *IN VITRO* CELLULÁRIS MIKRONUKLEUSZ-VIZSGÁLAT EMLŐSÖKÖN

B.50. BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: LOKÁLIS NYIROKCSOMÓ-VIZSGÁLATI MÓDSZER (LLNA): DA

B.51. BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: LOKÁLIS NYIROKCSOMÓ-VIZSGÁLATI MÓDSZER (LLNA): BRDU-ELISA

B.52. AKUT INHALÁCIÓS TOXICITÁS – AKUT TOXIKUS OSZTÁLY MÓDSZER

B.53. FEJLŐDÉSI NEUROTOXICITÁSI VIZSGÁLAT

B.54. UTEROTROFIKUS BIOLÓGIAI VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKBAN: GYORS SZŰRŐVIZSGÁLAT AZ ÖSZTROGÉNSZERŰ TULAJDONSÁGOK KIMUTATÁSÁRA

B.55. HERSHBERGER BIOASSAY PATKÁNYOKBAN: GYORS SZŰRŐVIZSGÁLAT AZ (ANTI)ANDROGÉN TULAJDONSÁGOK KIMUTATÁSÁRA

B.56. KIBŐVÍTETT EGYGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT

B.57. H295R SZTEROIDOGENEZIS-VIZSGÁLAT

B.58. TRANSZGENIKUS RÁGCSÁLÓ SZOMATIKUS ÉS CSÍRASEJT GÉNMUTÁCIÓS VIZSGÁLATOK

B.59. *IN CHEMICO* BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: KÖZVETLEN PEPTIDREAKTIVITÁSI VIZSGÁLAT

B.60. *IN VITRO* BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: ARE-NRF2 LUCIFERÁZ ALAPÚ VIZSGÁLATI MÓDSZER

B.61. FLUORESZCEIN-SZIVÁRGÁSON ALAPULÓ VIZSGÁLAT A SZEMKORRÓZIÓT ÉS A SÚLYOS SZEMIRRITÁCIÓT OKOZÓ ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA

B.62. LÚGOS KÖZEGBEN VÉGZETT *IN VIVO* ÜSTÖKÖSVIZSGÁLAT EMLŐSÖKÖN

▼B

B.63. REPRODUKCIÓS/FEJLŐDÉSI TOXICITÁSI SZŰRŐVIZSGÁLAT

B.64. KOMBINÁLT ISMÉTELT DÓZISÚ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT ÉS REPRODUKCIÓS/FEJLŐDÉSI TOXICITÁSI SZŰRŐVIZSGÁLAT

B.65. *IN VITRO* BŐRKORRÓZIÓS MEMBRÁNBARRIER-VIZSGÁLATI MÓDSZER

B.66. STABILAN TRANSZFEKTÁLT TRANSZAKTIVÁCIÓS *IN VITRO* VIZSGÁLATOK ÖSZTROGÉNRECEPTOROK AGONISTÁINAK ÉS ANTAGONISTÁINAK ÉSZLELÉSÉRE

B.67. EMLŐSSEJTEKEN TIMIDIN-KINÁZ GÉNNEL VÉGZETT *IN VITRO* GÉNMUTÁCIÓS VIZSGÁLATOK

B.68. RÖVID EXPOZÍCIÓS IDEJŰ IN VITRO VIZSGÁLATI MÓDSZER i. A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁST OKOZÓ VEGYI ANYAGOK ÉS ii. A SZEMIRRITÁCIÓ VAGY A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁS TEKINTETÉBEN BESOROLÁST NEM IGÉNYLŐ VEGYI ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA

B.69. AZ EMBERI SZARUHÁRTYÁHOZ HASONLÓ REKONSTRUÁLT FELHÁMON (RhCE) ALAPULÓ VIZSGÁLATI MÓDSZER A SZEMIRRITÁCIÓ VAGY A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁS TEKINTETÉBEN BESOROLÁST NEM IGÉNYLŐ VEGYI ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA

B.70. A VEGYI ANYAGOK ÖSZTROGÉNRECEPTOROKHOZ KÖTÉSI AFFINITÁSÁNAK HUMÁN REKOMBINÁNS ÖSZTROGÉNRECEPTORRAL (hrER) TÖRTÉNŐ ÉSZLELÉSÉRE SZOLGÁLÓ *IN VITRO* VIZSGÁLATOK

B.71. A BŐRSZENZIBILIZÁCIÓS KÁROS KIMENETI ÚT (AOP) EGYIK KULCSFONTOSSÁGÚ ESEMÉNYÉVEL, A DENDRITIKUS SEJTEK AKTIVÁCIÓJÁVAL FOGLALKOZÓ *IN VITRO* BŐRSZENZIBILIZÁCIÓS VIZSGÁLATOK

▼B

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

A. A VIZSGÁLT ANYAG JELLEMZÉSE

A vizsgált anyag összetételét – beleértve a főbb szennyező anyagokat és a lényeges fizikaikémiai tulajdonságait, ill. az anyag stabilitását – a toxicitás-vizsgálat megkezdése előtt ismerni kell.

A vizsgált anyag fizikai-kémiai tulajdonságai döntő fontosságúak az adagolási mód kiválasztásánál, az egyes vizsgálatok megtervezésénél, a vizsgált anyag kezelésénél és tárolásánál.

A vizsgált anyagnak (amennyiben lehetséges, a legfontosabb szennyezésekkel együtt) az adagolási közegben és a biológiai anyagban történő mennyiségi és minőségi vizsgálatára vonatkozó analitikai módszer kifejlesztése megelőzi a vizsgálatok megkezdését.

Az azonosításra, a fizikai-kémiai tulajdonságok meghatározására, a tisztaságra és a vizsgált anyag viselkedésére vonatkozó összes információnak szerepelnie kell a vizsgálati jelentésben.

B. AZ ÁLLATOK GONDOZÁSA

A környezeti feltételek szigorú szabályozása és az állatoknak a fajnak megfelelő gondozása nagyon lényeges a toxicitásvizsgálatoknál.

i. *Tartási körülmények*

A kísérleti állatok elhelyezésének környezeti körülményit az adott faj igényeihez kell igazítani. Patkányok, egerek és tengerimalacok számára a megfelelő körülmények: 22 ± 3 °C szobahőmérséklet, 30–70 százalékos relatív páratartalom mellett; míg nyulak számára a megfelelő körülmények: 20 ± 3 °C hőmérséklet, 30–70 százalékos relatív páratartalom.

Néhány kísérleti eljárás különösen érzékeny a hőmérsékleti hatásokra, ezekben az esetekben a megfelelő környezeti körülményekre vonatkozó részleteket a vizsgálati módszer leírása tartalmazza. A toxikus hatások kutatása során, a hőmérsékletet és a páratartalmat minden esetben figyelni és rögzíteni kell és meg kell adni a vizsgálati jelentésben.

A világítás mesterséges, a világos és sötét szakaszok 12 óránként váltják egymást. A világításra vonatkozó adatokat feljegyzik és megadják a vizsgálati jelentésben.

Hacsak a módszer leírásában más nem szerepel, az állatok egyenként tartandók, vagy kis, azonos nemű egyedekből álló csoportokban összezárhatók; csoportos tartás esetén egy ketrecben legfeljebb öt állat tartható.

Az állatkísérletekről szóló jelentésében fontos megadni az állatok ketrecének típusát és az egyes ketrecekben tartott állatok számát, a vegyszer hatásának kitett időszak és az azt követő megfigyelés alatt egyaránt.

▼B

ii. *Etetési körülmények*

Az alkalmazott tápláléknak meg kell felelnie a vizsgált fajnak megfelelő, a táplálkozástudomány által meghatározott követelményeknek. Amikor a vizsgált anyagokat az állatok táplálékában adják be, akkor a tápértéket az anyag és a táplálék összetevőinek kölcsönhatása csökkentheti. Egy ilyen kölcsönhatás lehetőségét figyelembe kell venni a vizsgálat eredményeinek értelmezése során. Hagyományos laboratóriumi táplálás alkalmazható korlátozás nélküli ivóvízellátással. A táplálék típusának kiválasztását befolyásolhatja, hogy a tápláléknak és a vizsgált anyagnak a megfelelő keverékét kell biztosítani, ha ilyen módon adagolják a vizsgált anyagot.

A táplálék olyan szennyezései, amelyekről ismert, hogy befolyásolják a toxicitást, nem lehetnek jelen zavaró nagyságú koncentrációban.

C. **ALTERNATÍV VIZSGÁLATI MÓDSZEREK**

Az Európai Unió elkötelezett olyan alternatív módszerek kifejlesztése és jóváhagyása támogatására, amelyek az ismereteket ugyanolyan szinten biztosítják, mint a jelenlegi állatkísérletek, azonban kevesebb állatot használnak fel, kevesebb szenvedést okoznak az állatoknak vagy teljesen kiküszöbölik az állatok alkalmazását.

Ilyen módszerek alkalmazását (amint elérhetővé válnak), ahol csak lehet, meg kell fontolni, a veszély jellemzésével, az azt követő osztályozással, címkézéssel és az anyag belső tulajdonságaiból adódó veszély jelölésével kapcsolatos eljárásokban.

D. **KIÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS**

A vizsgálatok kiértékelésekor és értelmezésekor figyelembe kell venni azt, hogy az állati és az *in vitro* vizsgálatok eredményét milyen mértékben lehet közvetlenül kiterjeszteni az emberre, és ezért az emberre káros hatás bizonyítékait, ahol rendelkezésre állnak, fel lehet használni a vizsgálati eredmények megerősítésére.

E. **SZAKIRODALOM**

Ezeknek a módszereknek a többségét a Vizsgálati irányelvek elnevezésű OECD-program keretében fejlesztették ki, és azokat a Helyes Laboratóriumi Gyakorlat alapelveivel összhangban kell alkalmazni, az „adatok kölcsönös elfogadásának” széles körű biztosítása érdekében.

További tájékoztatás található az OECD-irányelvekben megadott szakirodalom jegyzékekben, illetve az egyéb helyeken kiadott vonatkozó irodalomban.

▼B

B.1a. **AKUT ORÁLIS TOXICITÁS – RÖGZÍTETT DÓZISÚ ELJÁRÁS**

1. **MÓDSZER**

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 420 (2001) módszerrel.

1.1. BEVEZETÉS

Az akut toxicitás megállapítására szolgáló hagyományos módszerek esetében a vizsgálat végpontját az állatok elpusztulása jelenti. A Brit Toxikológiai Társaság 1984-ben új megközelítést javasolt az akut toxicitás vizsgálatára, amely egy sor rögzített nagyságú dózis beadásán alapul (1). Ennél a megközelítésnél nem az állatok elpusztulása jelenti a vizsgálat végpontját, hanem a rögzített nagyságú dózisok valamelyikénél megfigyelt egyértelmű mérgezési tünetekre támaszkodtak. Az Egyesült Királyságban (2) és nemzetközileg (3) végzett *in vivo* validálási vizsgálatok után az eljárást 1992-ben hagyták jóvá mint vizsgálati módszert. Ezt követően egy vizsgálati sorozat (4)(5)(6) keretében matematikai modellek segítségével megvizsgálták a rögzített dózisú eljárás statisztikai tulajdonságait. Az *in vivo* és a modellvizsgálatok együttesen igazolták, hogy az eljárás reprodukálható, kevesebb kísérleti állatra van szükség hozzá, és kevesebb szenvedést okoz, mint a hagyományos módszerek, továbbá hasonló módon képes minősíteni az anyagokat, mint az egyéb akut toxicitási vizsgálati módszerek.

Arról, hogy egy adott célra melyik a legmegfelelőbb vizsgálati módszer, az Akut Orális Toxicitási Vizsgálatok Útmutatójában (7) található iránymutatás. Ez az útmutató további információkat is tartalmaz az 1Ba. vizsgálati módszer alkalmazásával és értelmezésével kapcsolatosan.

A módszer egyik alapelve, hogy a fő vizsgálatban csak közepesen toxikus dózisokat alkalmaznak, és hogy kerülni kell az olyan dózisok alkalmazását, amelyek várhatóan letálisak. Nincs szükség továbbá olyan dózisok alkalmazására sem, amelyek korróziós vagy súlyosan irritáló hatásuk miatt kifejezett fájdalmat vagy szorongást okoznak. Az elhullás közelében lévő állatokat vagy azokat, amelyek nyilvánvalóan fájdalmakkal küszködnek, vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutatják, humánus módon exterminálni kell, és ugyanúgy kell figyelembe venni őket a vizsgálati eredmények értelmezésekor, mint azokat az állatokat, amelyek elhullottak a vizsgálatok során. A megjósolható vagy közeli elhullás felismerését segítő iránymutatás, valamint az elhullás közelében lévő vagy súlyosan szenvedő állatok exterminálására vonatkozó döntési kritériumok egy másik útmutatóban (8) találhatók.

A módszer adatokat szolgáltat az anyag veszélyes tulajdonságairól és lehetővé teszi, hogy az anyagot az akut toxicitást okozó anyagok besorolására szolgáló Globálisan harmonizált rendszer (Globally Harmonised System, GHS) szerint minősítsék és sorolják be (9).

A vizsgáló laboratóriumnak a vizsgálat elvégzése előtt a vizsgálandó anyaggal kapcsolatos minden rendelkezésre álló információt figyelembe kell vennie. Ilyen információk az anyag megjelölése és kémiai szerkezete; fizikai-kémiai tulajdonságai; bármely más, az anyaggal elvégzett *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálat eredményei; szerkezetileg rokon anyagok toxikológiai adatai és az anyag várható alkalmazása(i). Ezekre az információkra azért van szükség, hogy minden érintett meggyőződjön arról, hogy a vizsgálat releváns az emberi egészség védelme szempontjából, és elősegíti majd a megfelelő kezdődózis kiválasztását.

▼B

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Akut orális toxicitás: a vizsgálandó anyag egyszeri vagy 24 órán belül többszöri dózisának szájon át történő beadását követően jelentkező káros hatások.

Késleltetett elhullás: egy állat 48 órán belül nem hull el, illetve nem tűnik elhullásközeli állapotban lévőnek, de később, a 14 napos megfigyelési időszak során elpusztul.

Dózis: a vizsgálandó anyag beadott mennyisége. A dózist a vizsgálandó anyagnak a kísérleti állatok testtömegegységére számított tömegében (pl. mg/kg) fejezik ki.

Nyilvánvaló toxicitás: a vizsgálandó anyag beadását követően jól látható mérgezési tüneteket leíró általános kifejezés (a példákat lásd a (3) hivatkozásban), amelynél a következő legmagasabb rögzített dózis esetében a legtöbb állatnál súlyos fájdalom vagy súlyos szorongás tartós jelei, elhullásközeli állapot (az ezzel kapcsolatos kritériumok a Humane Endpoints Guidance Documentben (8) szerepelnek), vagy valószínű elhullás várható.

GHS: Globálisan harmonizált osztályozási rendszer vegyi anyagokhoz és keverékekhez. Az OECD (emberi egészség és környezet), az ENSZ Veszélyes Anyagok Szállításának Szakértői Bizottsága (fizikai-kémiai tulajdonságok) és az ILO (veszély nyilvánosságra hozatala) közös tevékenysége, amelyet a Szervezetek közötti program a vegyi anyagok helyes kezelésére (Interorganisation Programme of the Sound Management of Chemicals, IOMC) koordinál.

Közeli elhullás: amikor a legközelebbi tervezett megfigyelés időpontja előtt elhullásközeli állapot kialakulása vagy elhullás várható. Rágcsálók esetében erre utaló jelek lehetnek a görcsök, az oldalhelyzet, a fekvőhelyzet és a remegés. (A további részleteket lásd a Humane Endpoints Guidance Documentben (8)).

LD_{50}: (közepes letális dózis): a vizsgálandó anyag statisztikailag levezetett egyszeri olyan dózisa, amely orálisan beadva az állatok 50 %-ának elhullását okozza. Az LD_{50}-értéket a vizsgálandó anyagnak a kísérleti állatok testtömegegységére számított tömegében (mg/kg) fejezik ki.

Határdózis: egy, a vizsgálhatóság felső határánál lévő dózis (2 000 vagy 5 000 mg/kg).

Elhullásközeli állapot: az esetleges kezelés ellenére is az elhullás közelében lévő állapot vagy túlélésre való képtelenség. (A további részleteket lásd a Humane Endpoints Guidance Documentben (8)).

Megjósolható elhullás: a kísérlet tervezett vége előtt, a jövőben egy ismert időpontban való elhullásra utaló klinikai tünetek megléte, például: a víz vagy az élelem elérésére való képtelenség. (A további részleteket lásd Humane Endpoints Guidance Documentben (8)).

▼B

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Azonos ivarba tartozó állatok csoportjainak egy lépcsőzetes eljárás során 5, 50, 300 és 2 000 mg/kg-os rögzített dózisok alkalmazásával kell beadni a vizsgálandó anyagot (kivételes esetben egy további, 5 000 mg/kg-os rögzített dózis is alkalmazható; lásd az 1.6.2. szakaszt). A kiindulási dózist a dózisbehatároló vizsgálat alapján kell megválasztani úgy, hogy az várhatóan mérgezési tüneteket eredményezzen, de ne okozzon súlyos mérgezést vagy elhullást. A fájdalomhoz, szenvedéshez és közeli elhulláshoz társuló klinikai tüneteket és állapotot részletesen egy külön OECD Útmutató (8) ismerteti. A mérgezési tünetek megjelenésétől vagy az elhullás bekövetkeztétől vagy ezek elmaradásától függően további állatcsoportok is kezelhetők magasabb vagy alacsonyabb rögzített dózissal. Az eljárást folytatni kell, amíg meg nem találják azt a dózist, amely nyilvánvaló toxicitást vagy legfeljebb egy elhullást okoz, vagy ha a legmagasabb dózisnál nem figyelnek meg semmilyen hatást, vagy ha a legalacsonyabb dózisnál elhullanak állatok.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ISMERTETÉSE

1.4.1. **Az állatfaj kiválasztása**

A preferált rágcsálófaj a patkány, bár más rágcsálófajok is alkalmazhatók. Általában nőstényeket használnak (7). Ennek az az oka, hogy a hagyományos LD_{50}-vizsgálatokra vonatkozó szakirodalom áttekintése alapján általában kicsi a különbség a nemek érzékenysége között, de azokban az esetekben, amikor megfigyelhető különbség, a nőstények általában valamivel érzékenyebbek (10). Azonban ha a szerkezetileg rokon vegyületek toxikológiai vagy toxikokinetikai tulajdonságaival kapcsolatos adatok szerint a hímek nagyobb érzékenysége valószínűsíthető, akkor hímeket kell alkalmazni. Megfelelően meg kell indokolni, ha a vizsgálatot hímekkel végzik.

Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal felnőtt állatokat kell alkalmazni. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. Az adagolás megkezdésekor az állatoknak 8–12 hetesnek kell lenniük, és testtömegük nem térhet el ± 20 %-nál többel az esetlegesen korábban kezelt állatok testtömegének átlagától.

1.4.2. **Az állatok tartásának és etetésének körülményei**

A kísérleti állatokat 22 °C (± 3 °C) hőmérsékletű helyiségben kell tartani. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50 és 60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. Az állatokat lehet vizsgált dózisonként egy ketrecben tartani, de az egy ketrecben lévő állatok számát úgy kell megválasztani, hogy az ne zavarja az egyes állatok megfigyelését.

1.4.3. **Az állatok előkészítése**

Az állatokat véletlenszerűen kell kiválasztani, majd egyedi azonosítóval kell ellátni, és a kezelés megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben kell tartani őket, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez.

▼B

1.4.4. **A dózisok előkészítése**

A vizsgálandó anyagokat általában a vizsgálandó dózistartományon belül állandó térfogatban kell beadni úgy, hogy a dóziskészítmény koncentrációját változtatják. Azonban ha folyékony végterméket vagy keveréket vizsgálnak, a vizsgálatot követő kockázatértékelés szempontjából megfelelőbb lehet, ha a vizsgálandó anyagot hígítatlanul, azaz állandó koncentrációban alkalmazzák, illetve egyes szabályozó hatóságok ezt írják elő. A maximálisan beadható dózistérfogatot azonban egyik esetben sem szabad túllépni. Az, hogy egyszerre maximálisan mekkora térfogatú folyadékot lehet beadni, a kísérleti állat méretétől függ. Rágcsálók esetében a térfogat általában nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömegarányt: vizes oldatok esetében azonban 2 ml/100 g testtömegarány is megfontolható. A dóziskészítmény formulázásakor – ahol lehet – a vizes oldatok/szuszpenziók/emulziók alkalmazása javasolt, másodsorban az olajos (pl. kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatok/szuszpenziók/emulziók, és harmadsorban esetlegesen más vivőanyagokban elkészített oldatok. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. A dózisokat a beadás előtt rövid idővel kell elkészíteni, kivéve, ha ismert és igazoltan elfogadható a készítmény stabilitása az alkalmazás időtartama alatt.

1.5. ELJÁRÁS

1.5.1. **A dózisok beadása**

A vizsgálandó anyagot egyetlen dózisban, gyomorszondán vagy egy megfelelő intubációs kanülön át történő táplálással kell beadni. Abban a rendkívüli esetben, ha nem lehetséges egyetlen dózist alkalmazni, a dózis egy 24 órát nem meghaladó időtartam alatt kisebb részletekben is beadható.

A kezelés előtt az állatokat éheztetni kell (pl. patkány esetében egy éjszakán át meg kell vonni a táplálékot, de a vizet nem; egér esetében 3–4 órára kell megvonni a táplálékot, de a vizet nem). A koplaltatási időszakot követően meg kell mérni az állatok testtömegét, majd be kell adni a vizsgálandó anyagot. Az anyag beadása után a táplálékot újra meg lehet vonni -patkány esetében 3–4 órára, egér esetében 1–2 órára. Ha egy dózist részletekben adnak be, a beadás időtartamától függően menet közben szükség lehet arra, hogy az állatoknak táplálékot és vizet adjanak.

1.5.2. **Dózisbehatároló vizsgálat**

A dózisbehatároló vizsgálat célja, hogy ki lehessen választani a megfelelő kezdődózist a fő vizsgálathoz. A vizsgálandó anyagot az 1. függelékben bemutatott folyamatábra szerint egymás után kell beadni egy-egy állatnak. A dózisbehatároló vizsgálat akkor fejeződik be, amikor meghozható a döntés a fő vizsgálatban alkalmazandó kezdődózisról (vagy ha a legalacsonyabb rögzített dózisnál elhullás történik).

A dózisbehatároló vizsgálatban a kezdődózist a következő rögzített dózisok közül választják ki: 5, 50, 300 és 2 000 mg/kg aszerint, hogy a lehetőleg ugyanezzel az anyaggal vagy szerkezetileg rokon anyagokkal kapott *in vivo* vagy *in vitro* adatok alapján várhatóan melyik eredményez nyilvánvaló toxicitást. Ilyen információk hiányában a kezdődózist 300 mg/kg-ban kell megállapítani.

Az egyes állatok kezelése között legalább 24 órának el kell telnie. Minden állatot legalább 14 napig megfigyelés alatt kell tartani.

▼B

Kivételes esetben és kizárólag akkor, ha konkrét jogszabályi követelmény indokolja, megfontolás tárgyává lehet tenni egy további, 5 000 mg/kg-os felső rögzített dózis alkalmazását (lásd a 3. függeléket). Az állatok kímélete érdekében a GHS 5. kategóriában (2 000–5 000 mg/kg tartomány) nem ajánlott állatokkal kísérletezni, és csak abban az esetben szabad ilyet tervezni, ha nagy a valószínűsége, hogy egy ilyen vizsgálat eredményei közvetlen jelenőséggel bírnak az emberi vagy állati egészség, illetve a környezet védelme szempontjából.

Olyan esetekben, amikor a dózisbehatároló vizsgálatban a legalacsonyabb rögzített dózissal (5 mg/kg) kezelt állat elhullik, az általános eljárás szerint be kell fejezni a vizsgálatot és az anyagot a GHS 1. kategóriába kell besorolni (ahogyan az az 1. függelékben látható). Ha azonban szükség van a besorolás további megerősítésére, az alábbiak szerinti opcionális kiegészítő eljárás alkalmazható. Egy második állatnak is beadjuk az 5 mg/kg-os dózist. Ha ez is elhullik, akkor az megerősíti a GHS 1. kategóriába való besorolást, és a vizsgálatot azonnal be kell fejezni. Ha a második állat életben marad, akkor legfeljebb három további állaton kell elvégezni az 5 mg/kg-os dózissal történő vizsgálatot. Mivel nagy az elhullás kockázata, az állatok kímélete érdekében egymás után kell őket kezelni. Az egyes állatok kezelése között eltelt időt úgy kell megválasztani, hogy elegendő legyen annak megállapítására, hogy az előzőleg kezelt állat valószínűleg életben marad. Ha egy második állat is elhullik, azonnal be kell fejezni a kezeléseket, és több állatnak már nem szabad beadni az anyagot. Mivel a második elhullás bekövetkezte miatt (függetlenül attól, hogy a vizsgálatok befejezéséig hány állatot kezeltek) az „A” eredményhez jutnak (legalább 2 elhulláseset), a 2. függelék 5 mg/kg-os rögzített dózisánál érvényes besorolási szabályt kell követni (ha legalább 2 elhullás történt, akkor 1. kategória, ha legfeljebb 1 elhullás történt, akkor 2. kategória). A 4. függelékben pedig azzal kapcsolatos útmutatást tartalmaz, hogy az új GHS bevezetéséig az anyagokat hogyan kell az EU-rendszer szerinti kategóriákba besorolni.

1.5.3. **Fő vizsgálat**

1.5.3.1. *Az állatok száma és a dózisok*

A kezdődózissal történő vizsgálat utáni teendőket a 2. függelékben található folyamatábra mutatja. Három lehetséges alternatíva létezik: vagy le kell állítani a vizsgálatot, és be kell sorolni az anyagot a megfelelő veszélyességi kategóriába, vagy magasabb rögzített dózissal kell folytatni a vizsgálatot, vagy alacsonyabb rögzített dózissal. Az állatok védelme érdekében azonban a fő vizsgálatban már nem szabad olyan dózissal kísérletezni, amely a dózisbehatároló vizsgálatban elhullást okozott (lásd a 2. függeléket). A tapasztalatok azt mutatják, hogy a kezdődózissal végzett vizsgálatok legvalószínűbb eredménye, hogy az anyagot be lehet valamilyen kategóriába sorolni és nincs szükség további vizsgálatokra.

Általában összesen öt-öt, azonos ivarú állatnak kell beadni az egyes vizsgált dózisokat. Ebből az öt állatból egyet a dózisbehatároló vizsgálat során kezelnek az adott dózissal, és ehhez járul a további négy állat (kivéve abban a szokatlan esetben, ha a fő vizsgálatban használt dózist nem alkalmazták a dózisbehatároló vizsgálatban).

Az egyes dózisok vizsgálata közötti időtartamot a mérgezési tünetek megjelenésének időpontja, időtartama és súlyossága határozza meg. Az állatok következő dózissal történő kezelését nem szabad megkezdeni mindaddig, amíg meg nem bizonyosodtak arról, hogy az előzőleg kezelt állatok életben maradnak. Szükség esetén ajánlott ez egyes dózisokkal való kezelések között 3 vagy 4 napos szünetet tartani, hogy meg lehessen figyelni a késleltetett toxicitást. Ennek időtartama szükség esetén – pl. nem meggyőző válasz esetében –módosítható.

▼B

Ha egy felső, 5 000 mg/kg-os dózis alkalmazást is tervbe vesznek, a 3. függelékben vázolt eljárást kell követni (lásd még az 1.6.2. szakaszt).

1.5.3.2. *Határérték-vizsgálat*

Határérték-vizsgálatot elsősorban olyan helyzetekben kell végezni, ha a kísérletet végzőnek olyan információi vannak, amelyek szerint a vizsgálandó anyag valószínűleg nem toxikus, azaz csak a hatósági határértékdózisok felett toxikus. A vizsgálandó anyag toxicitásával kapcsolatban hasonló vegyületek vagy keverékek vagy termékek vizsgálataiból szerezhető információ, figyelembe véve a toxikológiai szempontból fontos komponenseket, illetve azok százalékos arányát. Olyan esetekben, ha kevés az anyag toxicitásával kapcsolatos információ, vagy egyáltalán nem áll rendelkezésre, vagy ha a vizsgálandó anyag várhatóan toxikus, a fő vizsgálatot kell elvégezni.

Ezen iránymutatás céljára határérték-vizsgálatként a normál eljárás alkalmazásával történő, 2 000 mg/kg-os (vagy kivételes esetben 5 000 mg/kg-os) kezdődózissal végzett dózisbehatároló vizsgálat, majd ezt követően további négy állat ugyanezzel a dózissal történő kezelése szolgál.

1.6. MEGFIGYELÉSEK

Az állatokat a dózis beadása után egyedileg kell megfigyelni, legalább az első 30 percben, azután az első 24 órában rendszeres időközönként, amelynek során különös figyelemmel kell őket kísérni az első 4 órában, majd ezt követően naponta, összesen 14 napon át, kivéve, ha az állatot állatjóléti okok miatt ki kell venni a vizsgálatból, és humánus módon exterminálni kell, vagy ha az állat elhullik. A megfigyelés időtartamát azonban nem szabad mereven meghatározni. Ezt a mérgezési reakciók, illetve a gyógyulás kezdete és időtartama alapján kell meghatározni, és ilyen módon szükség esetén meg lehet hosszabbítani. Fontos a mérgezési tünetek megjelenésének, illetve megszűnésének időpontja, különösen, ha a mérgezési tünetek inkább késleltetve jelentkeznek (11). Minden megfigyelést szisztematikusan rögzíteni kell olyan módon, hogy minden állat esetében önálló adatsort vesznek fel.

Ha a mérgezési tünetek tartósak, további megfigyelésekre van szükség. Meg kell figyelni a bőr és a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák, valamint a légzési és a keringési rendszer, az autonóm és a központi idegrendszer, illetve a szomatomotoros aktivitás és a viselkedési mintázatok változásait. Figyelemmel kell lenni remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma előfordulására is. A Humane Endpoints Guidance Documentben összefoglalt alapelveket és követelményeket is figyelembe kell venni (8). Humánus módon exterminálni kell az elhullásközeli állapotban lévő állatokat, illetve azokat, amelyek súlyos fájdalom vagy tartós szorongás jeleit mutatják. Ha az állatokat humánus okok miatt exterminálni kell, vagy elhullanak, a lehető legpontosabban fel kell jegyezni az elhullás időpontját is.

1.6.1. **Testtömeg**

Röviddel a vizsgálandó anyag beadása előtt és legalább egy héttel utána minden állat testtömegét egyenként meg kell mérni. A testtömeg-változást ki kell számítani és fel kell jegyezni. A vizsgálat végén az életben maradt állatokat újra meg kell mérni, majd humánus módon exterminálni kell őket.

▼B

1.6.2. **Kórbonctani vizsgálat**

Minden kísérleti állatot makroszkópos boncolásnak kell alávetni (azokat is, amelyek a vizsgálat során elpusztultak, vagy amelyeket állatjóléti okok miatt ki kellett venni a vizsgálatból). Minden állat esetében az összes makroszkópos kórtani elváltozást fel kell jegyezni. A kezdődózis beadása után legalább 24 óráig túlélő állatok esetében tervbe lehet venni a makroszkópos kórtani elváltozást mutató szervek mikroszkópos vizsgálatát is, mivel abból hasznos információk nyerhetők.

2. **ADATOK**

Az állatokra vonatkozóan egyedi adatsorokat kell felvenni. Emellett az összes adatot táblázatos formában is össze kell foglalni úgy, hogy minden vizsgálati csoportra vonatkozóan mutassa a csoportban lévő kísérleti állatok számát, valamint azoknak a számát, amelyeknél mérgezési tünetek láthatók, amelyek a vizsgálat során elhullottak vagy humánus módon exterminálásra kerültek, az egyes állatok elhullásának időpontját, a toxikus hatások leírását, időbeli lefolyását és visszafordíthatóságát, valamint a boncolások eredményeit.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek megfelelő módon a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

— fizikai megjelenés, tisztaság és ha releváns, a fizikai-kémiai tulajdonságok (ezen belül az izomerizáció is),

— azonosító adatok, ezen belül a CAS-szám.

Vivőanyag (szükség esetén):

— ha a vivőanyag nem víz, akkor ennek indoklása.

Kísérleti állatok:

— az alkalmazott faj/törzs,

— az állatok mikrobiológiai státusza, feltéve, hogy ismert,

— az állatok száma, életkora és ivara (ezen belül adott esetben annak oka, hogy nőstények helyett miért hímeket alkalmaztak),

— az állatok származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.

Kísérleti körülmények:

— a vizsgálandó anyag formulázására vonatkozó információk, ezen belül a beadott anyag fizikai formájával kapcsolatos adatok,

— a vizsgálandó anyag beadására vonatkozó információk, ezen belül a beadott térfogat és a beadás időpontja,

— a táplálék és a víz minősége (ezen belül a takarmány típusa/forrása, a víz forrása),

— a kezdődózis kiválasztásának indoklása.

▼B

Eredmények:

— a válaszadatok és a dózisok táblázatos formában történő megadása minden egyes állatra vonatkozóan (azaz a mérgezési tüneteket mutató és elhullt állatokra; a hatások jellege, súlyossága és időtartama),

— a testtömegadatok és a testtömegváltozások táblázatos formában történő megadása,

— az egyes állatok testtömege a dózis beadásának napján, azt követően hetente, valamint az elhullás vagy exterminálás időpontjában,

— a tervezett exterminálás előtti elhullás napja és ideje,

— a mérgezési tünetek megjelenése és időbeli lefolyása, valamint esetleges visszafordíthatósága minden egyes állatra vonatkozóan,

— a boncolások és adott esetben a kórszövettani vizsgálatok eredményei minden egyes állatra vonatkozóan.

Az eredmények diszkussziója és értelmezése.

Következtetések.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(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 LD50 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 Assessment N. 19.

▼B

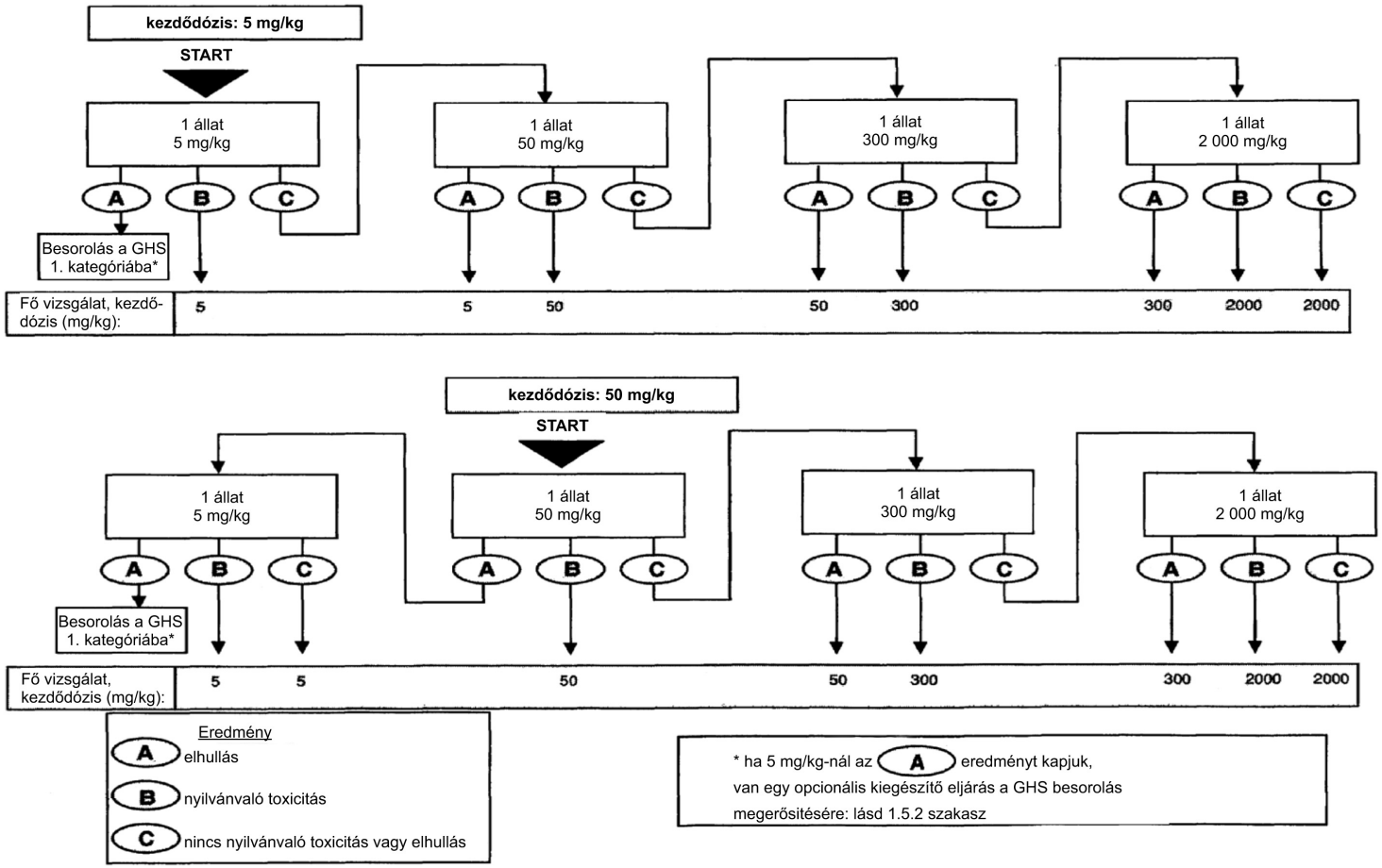
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I. Goddard, M., Segal, L., Springer, 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.

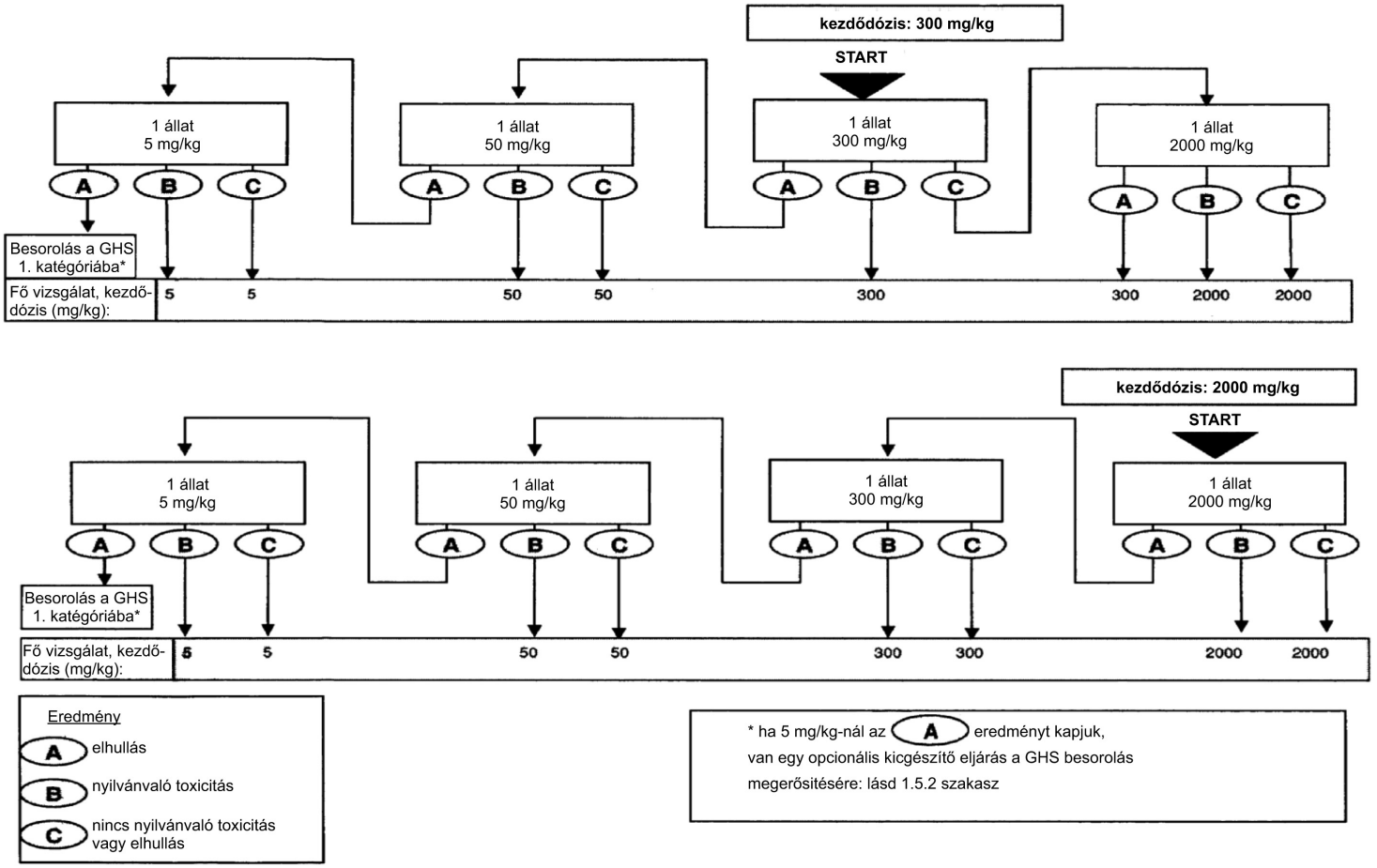
(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

1. FÜGGELÉK

A DÓZISBEHATÁROLÓ VIZSGÁLAT FOLYAMATÁBRÁJA

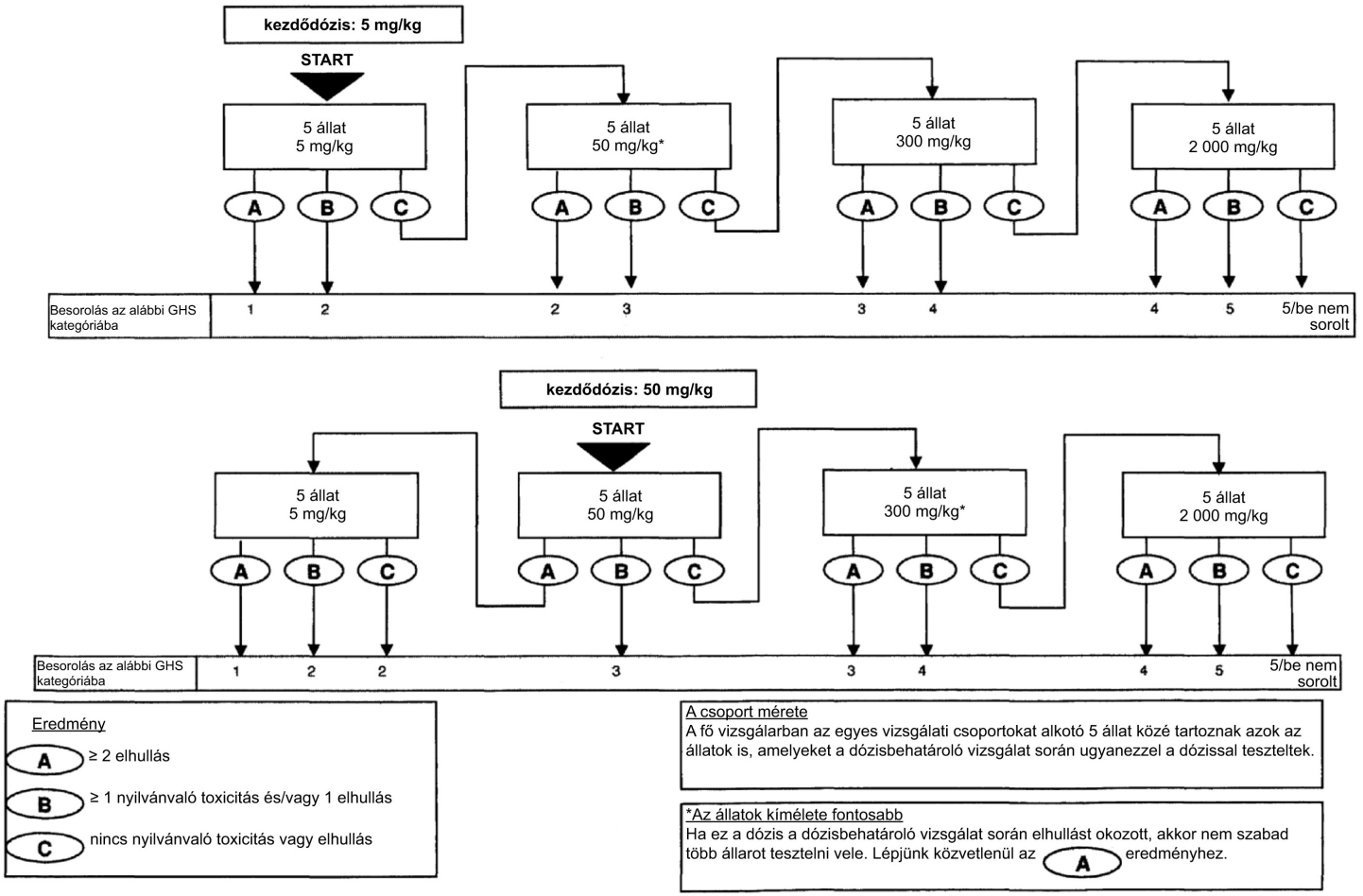


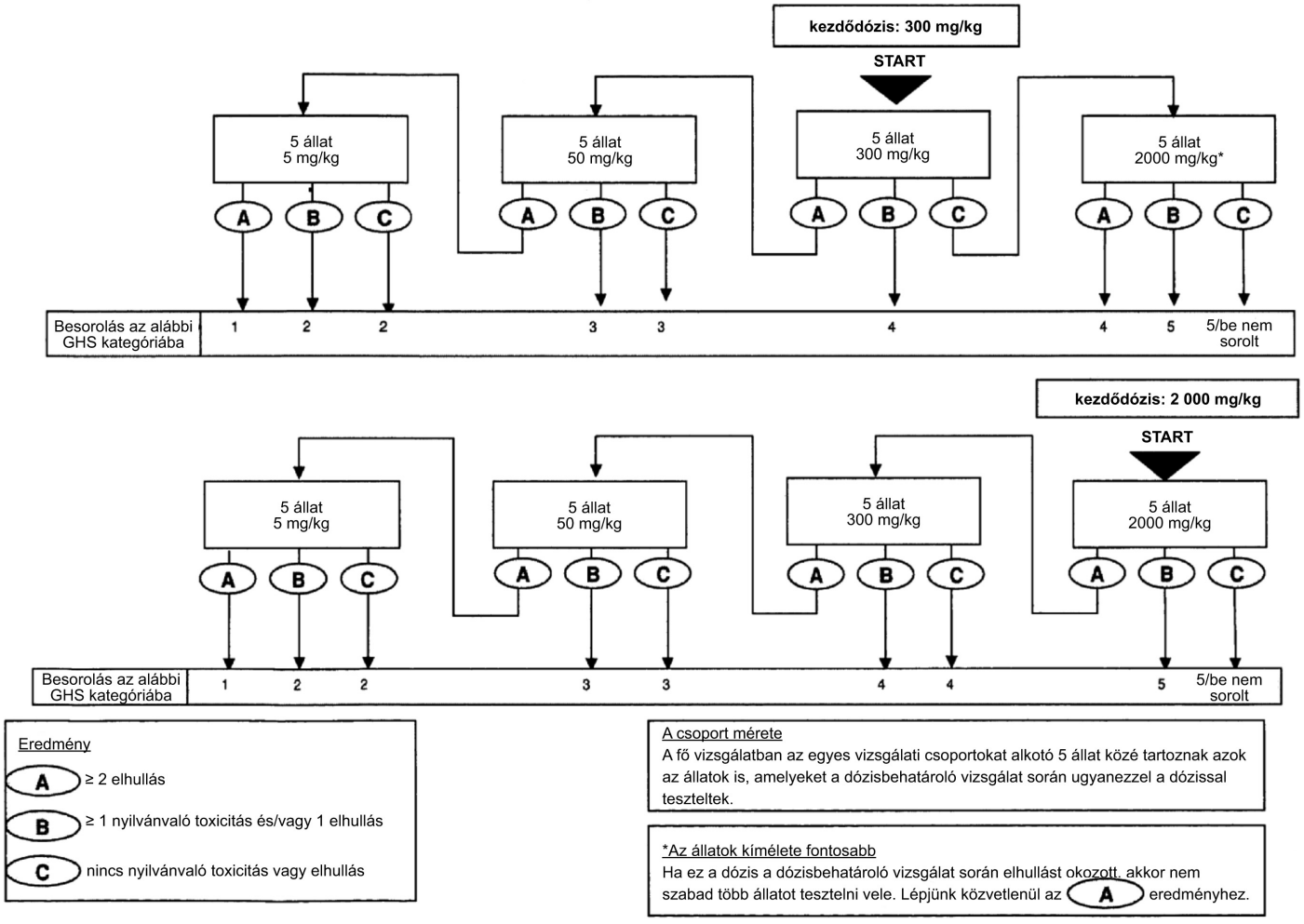
▼B


kezdődózis: 300 mg/kg
START
1 állat
5 mg/kg
1 állat
50 mg/kg
1 állat
300 mg/kg
1 állat
2000 mg/kg
A
B
C
Besorolás a GHS
1. kategóriába*
Fő vizsgálat, kezdő-
dózis (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
kezdődózis: 2000 mg/kg
START
1 állat
5 mg/kg
1 állat
50 mg/kg
1 állat
300 mg/kg
1 állat
2000 mg/kg
Besorolás a GHS
1. kategóriába*
Fő vizsgálat, kezdő-
dózis (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Eredmény
A elhullás
B nyilvánvaló toxicitás
C nincs nyilvánvaló toxicitás
vagy elhullás
* ha 5 mg/kg-nál az A eredményt kapjuk,
van egy opcionális kicgészítő eljárás a GHS besorolás
megerősitésére: lásd 1.5.2 szakasz

2. FÜGGELÉK:

A FŐ VIZSGÁLAT FOLYAMATÁBRÁJA




kezdődózis: 300 mg/kg
START
5 állat
5 mg/kg
5 állat
50 mg/kg
5 állat
300 mg/kg
5 állat
2000 mg/kg*
A
B
C
Besorolás az alábbi GHS kategóriába
1
2
2
3
3
4
4
5
5/be nem sorolt
kezdődózis: 2 000 mg/kg
START
5 állat
5 mg/kg
5 állat
50 mg/kg
5 állat
300 mg/kg
5 állat
2000 mg/kg
Besorolás az alábbi GHS kategóriába
1
2
2
3
3
4
4
5
5/be nem sorolt
Eredmény
A ≥ 2 elhullás
B ≥ 1 nyilvánvaló toxicitás és/vagy 1 elhullás
C nincs nyilvánvaló toxicitás vagy elhullás
A csoport mérete
A fő vizsgálatban az egyes vizsgálati csoportokat alkotó 5 állat közé tartoznak azok az állatok is, amelyeket a dózisbehatároló vizsgálat során ugyanezzel a dózissal teszteltek.
*Az állatok kímélete fontosabb
Ha ez a dózis a dózisbehatároló vizsgálat során elhullást okozott, akkor nem szabad több állatot tesztelni vele. Lépjünk közvetlenül az A eredményhez.

▼B

3. FÜGGELÉK

A VÁRHATÓAN 2 000 MG/KG FELETTI LD_{50}-ÉRTÉKKEL RENDELKEZŐ VIZSGÁLANDÓ ANYAGOK VIZSGÁLATOK NÉLKÜLI OSZTÁLYOZÁSÁNAK KRITÉRIUMAI

Az 5. veszélyességi kategória kritériumait úgy állapították meg, hogy lehetővé tegyék azoknak a vizsgálandó anyagoknak a meghatározását, amelyek akut toxicitási kockázata viszonylag alacsony, de bizonyos körülmények között veszélyt jelenthetnek az érzékeny populációkra. Az ilyen anyagok orális vagy dermális LD50-értéke várhatóan 2 000 és 5 000 mg/kg közötti tartományban van, vagy ezzel egyenértékű dózisoknak megfelelő az egyéb beadási módok esetében. A vizsgálandó anyagokat az alábbi esetekben lehet a 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg veszélyességi kategóriába (GHS 5. kategória) sorolni:

a) ha a 2. függelékben bemutatott, az elhullási gyakoriságon alapuló vizsgálati sémák bármelyike szerint ebbe a kategóriába kell sorolni;

b) ha hitelt érdemlő bizonyíték van már arra, hogy az anyag LD50-értéke az 5. kategóriában megadott tartományba esik; vagy más állatkísérletek vagy humán toxikus hatások akut jellegű humán egészségügyi veszélyt jeleznek;

c) adatok extrapolálásával, becslésével vagy mérésével, ha egy veszélyesebb osztályba való besorolás nem indokolt, és

— hitelt érdemlő információk állnak rendelkezésre, amelyek emberben jelentős toxikus hatásokra utalnak, vagy

— a legfeljebb a 4. kategóriának megfelelő értékekkel elvégzett, orális beadási móddal történő vizsgálatok során elhullás történt, vagy

— ha legfeljebb a 4. kategóriának megfelelő értékekkel elvégzett vizsgálat alapján a szakértők véleménye megerősíti a toxicitás szignifikáns klinikai tüneteit, kivéve a hasmenést, szőrmeredezést vagy gondozatlan megjelenést, vagy

— ha a szakértők véleménye megerősíti azokat a hitelt érdemlő információkat, amelyek más állatkísérletekben tapasztalt szignifikáns akut hatásokat valószínűsítenek.

2 000 MG/KG FELETTI DÓZISOKKAL TÖRTÉNŐ VIZSGÁLAT

Kivételes esetben és kizárólag akkor, ha ezt konkrét jogszabályi követelmény indokolja, tervbe lehet venni egy további felső, 5 000 mg/kg-os rögzített dózis alkalmazást. Az állatok jólétének védelme iránti igényt elismerve nem ajánlott az 5 000 mg/kg-os dózis alkalmazása, és csak akkor szabad fontolóra venni, ha nagy a valószínűsége, hogy az ilyen vizsgálatok eredményei közvetlen jelentőséggel bírnak az állati vagy emberi egészség védelme szempontjából (9).

Dózisbehatároló vizsgálat

Az 1. függelékben bemutatott lépcsőzetes eljárás során irányadó döntési szabályokat ki lehet terjeszteni úgy, hogy 5 000 mg/kg-os dózisszintet is lehessen alkalmazni. Ha tehát a dózisbehatároló vizsgálathoz 5 000 mg/kg-os kezdődózist alkalmaznak, az „A” eredmény (elhullás) esetén egy második állatnak 2 000 mg/kg-os dózist kell beadni. „B” vagy „C” eredmény esetén (nyilvánvaló toxicitás vagy nincs toxicitás) a fő vizsgálatban 5 000 mg/kg-os kezdődózis is alkalmazható. Hasonló módon, ha az 5 000 mg/kg-os dózistól eltérő kezdődózist alkalmaznak, a 2 000 mg/kg-os dózis alkalmazásakor kapott „B” vagy „C” eredmény esetén a vizsgálatot 5 000 mg/kg-os dózissal kell folytatni. Ha ezt követően az „A” eredményhez jutnak, a fő vizsgálatban 2 000 mg/kg-os kezdődózist kell alkalmazni, „B” vagy „C” eredmény esetén pedig 5 000 mg/kg-os kezdődózist.

▼B

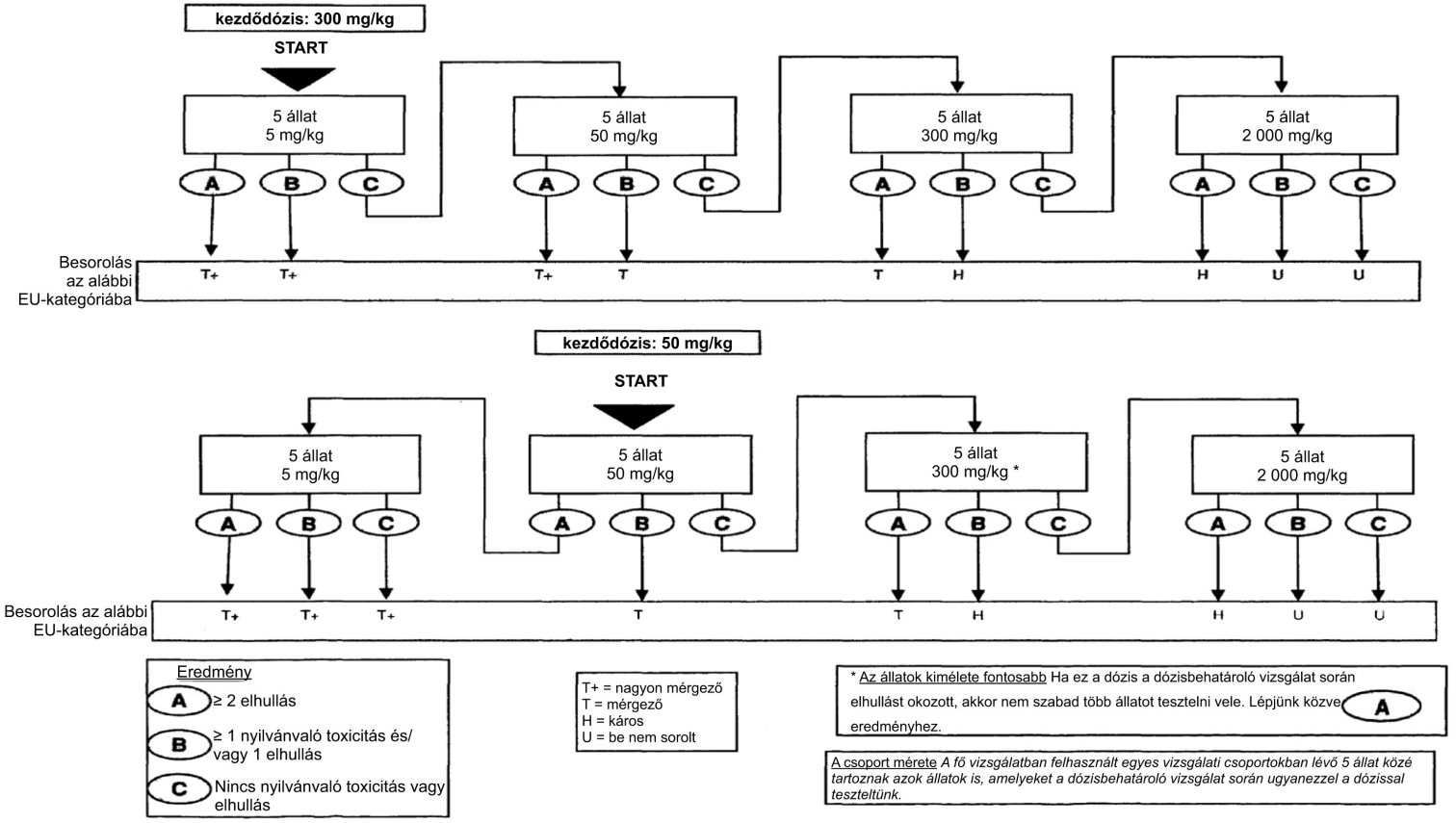
Fő vizsgálat

A 2. függelékben bemutatott lépcsőzetes eljárás során irányadó döntési szabályokat ki lehet terjeszteni úgy, hogy 5 000 mg/kg-os dózisszintet is lehessen alkalmazni. Ha tehát a fő vizsgálathoz 5 000 mg/kg-os kezdődózist alkalmaznak, az „A” eredmény (> 2 elhullás) esetén egy második csoportnak 2 000 mg/kg-os dózist kell beadni. „B” eredmény (nyilvánvaló toxicitás és/vagy < 1 elhullás) vagy „C” eredmény (nincs toxicitás) esetén az anyagot a GHS rendszer szerint be nem soroltnak kell tekinteni. Hasonló módon, ha az 5 000 mg/kg-os dózistól eltérő kezdődózist alkalmaznak, a 2 000 mg/kg-os dózis alkalmazásakor kapott „C” eredmény esetén a vizsgálatot 5 000 mg/kg-os dózissal kell folytatni. Ha ezt követően az „A” eredményhez jutnak, az anyagot a GHS 5. kategóriába kell sorolni, „B” vagy „C” eredmény esetén pedig be nem soroltnak kell tekinteni.

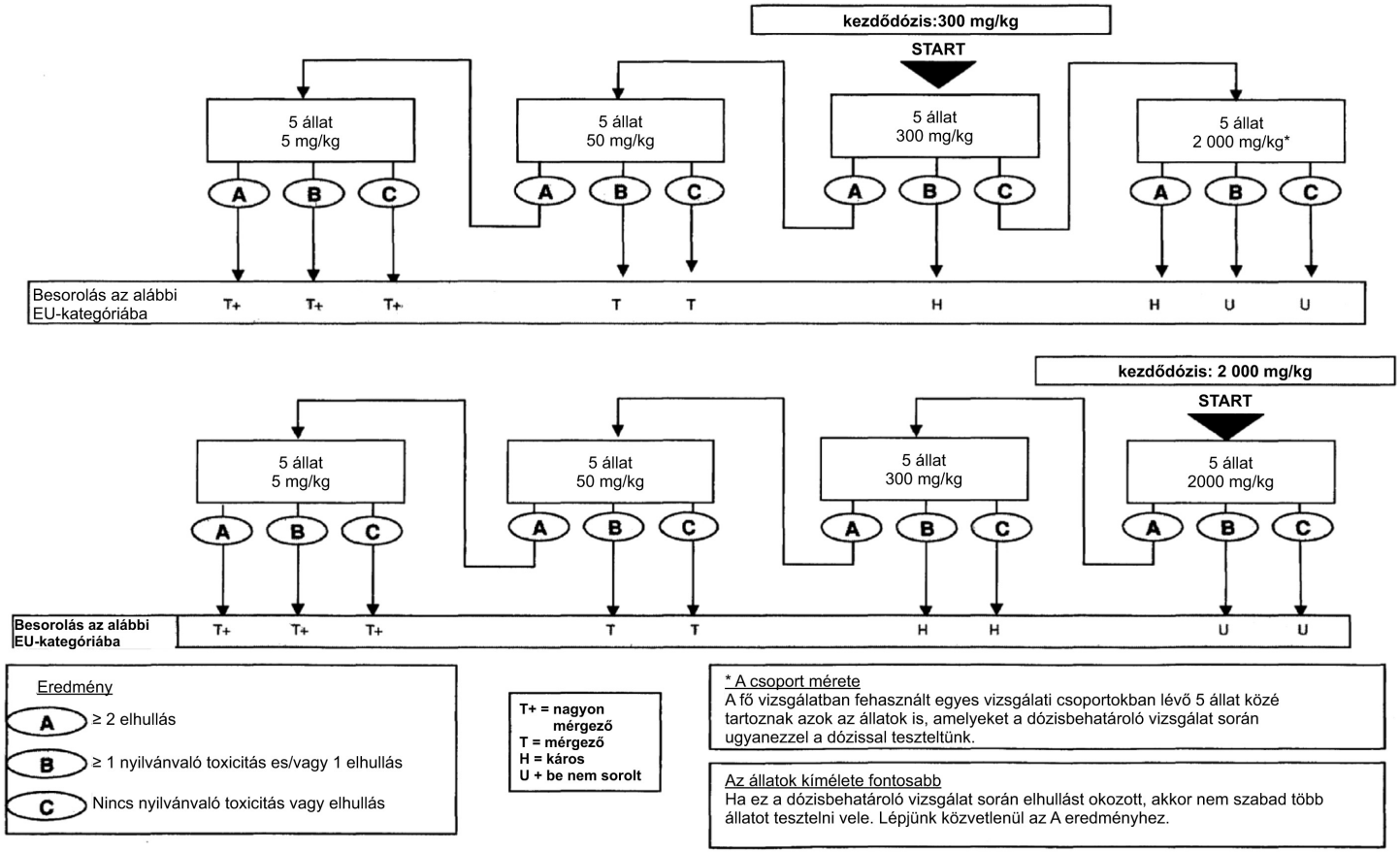
4. FÜGGELÉK

B.la. VIZSGÁLATI MÓDSZER

Útmutató az EU-rendszer szerinti besoroláshoz a Globálisan harmonizált osztályozási rendszer (GHS) teljes körű bevezetéséig tartó átmeneti időszakban (a (8) hivatkozásból)



▼B


kezdődózis:300 mg/kg
START
5 állat
5 mg/kg
5 állat
50 mg/kg
5 állat
300 mg/kg
5 állat
2 000 mg/kg*
A
B
C
Besorolás az alábbi
EU-kategóriába
T+
T
H
U
kezdődózis: 2 000 mg/kg
START
5 állat
5 mg/kg
5 állat
50 mg/kg
5 állat
300 mg/kg
5 állat
2000 mg/kg
Besorolás az alábbi
EU-kategóriába
Eredmény
A ≥ 2 elhullás
B ≥ 1 nyilvánvaló toxicitás es/vagy 1 elhullás
C Nincs nyilvánvaló toxicitás vagy elhullás
T+ = nagyon mérgező
T = mérgező
H = káros
U + be nem sorolt
* A csoport mérete
A fő vizsgálatban fehasznált egyes vizsgálati csoportokban lévő 5 állat közé tartoznak azok az állatok is, amelyeket a dózisbehatároló vizsgálat során ugyanezzel a dózissal teszteltünk.
Az állatok kímélete fontosabb
Ha ez a dózisbehatároló vizsgálat során elhullást okozott, akkor nem szabad több állatot tesztelni vele. Lépjünk közvetlenül az A eredményhez.

▼B

B.1b. **AKUT ORÁLIS TOXICITÁS – AKUT TOXIKUS OSZTÁLY MÓDSZER**

1. **MÓDSZER**

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 423 (2001) módszerrel.

1.1. BEVEZETÉS

Az itt ismertetett akut toxikus osztály módszer (1) egy lépcsőzetes eljárás, amelyben lépésenként három azonos ivarú állatot használnak. Az elhullási aránytól és/vagy az állatok elhullásközeli állapotától függően átlagosan 2–4 lépésre lehet szükség a vizsgálandó anyag akut toxicitásának megítéléséhez. Az eljárás reprodukálható, nagyon kevés állatot kell használni hozzá, és hasonló módon lehet vele minősíteni az anyagokat, mint a többi akut toxicitás vizsgálati módszerrel. Az akut toxikus osztály módszer rögzített dózisokkal végzett biometriai vizsgálatokon (2)(3)(4)(5) alapul, amelyek megfelelően el vannak választva egymástól, hogy lehetővé tegyék az anyag besorolási és veszélyfelmérési célokra történő minősítését. Az 1996-ban jóváhagyott módszert széles körben validálták a szakirodalomból vett *in vivo* LD_{50}-adatokkal szemben mind nemzeti (6), mind pedig nemzetközi (7) szinten.

Arról, hogy egy adott célra melyik a legmegfelelőbb vizsgálati módszer, az Akut Orális Toxicitási Vizsgálatok Útmutatójában (8) található iránymutatás. Ez az útmutató további információkat is tartalmaz a B.1c. vizsgálati módszer alkalmazásával és értelmezésével kapcsolatosan.

Nincs szükség a vizsgálandó anyagok olyan dózisokban történő alkalmazására, amelyek korróziós vagy súlyosan irritáló hatásuk miatt kifejezett fájdalmat vagy szorongást okoznak. Az elhullásközeli állapotban lévő állatokat vagy azokat, amelyek nyilvánvalóan fájdalmakkal küszködnek, vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutatják, humánus módon exterminálni kell, és ugyanúgy kell figyelembe venni őket az eredmények értelmezésekor, mint azokat az állatokat, amelyek elhullottak a vizsgálatok során. A megjósolható vagy közeli elhullás felismerését segítő iránymutatás, valamint az elhullás közelében lévő vagy súlyosan szenvedő állatok exterminálására vonatkozó döntési kritériumok egy másik útmutatóban (9) találhatók.

A módszer előre meghatározott dózisok alkalmazásán alapul, és a kapott eredmények lehetővé teszik, hogy az anyagot az akut toxicitást okozó anyagok besorolására szolgáló Globálisan harmonizált rendszer (GHS) szerint minősítsük és soroljuk be (10).

A módszer elvben nem alkalmas az LD_{50} pontos kiszámítására, de lehetővé teszi azoknak az expozíciós tartományoknak a meghatározását, amelyeknél letalitás várható, mivel a fő végpont ebben a vizsgálatban is az állatok egy részének elhullása. Ez a módszer csak akkor teszi lehetővé az LD_{50}-érték meghatározását, ha legalább két dózis 0 %-nál magasabb, de 100 %-nál alacsonyabb elhullási arányt eredményez. A vizsgálandó anyagtól függetlenül az előre meghatározott dózisok alkalmazása és a kifejezetten a különféle állapotokban megfigyelt állatok számához kötődő besorolás növeli a laboratóriumok által készített jelentések egységességét és a vizsgálatok ismételhetőségét.

▼B

A vizsgáló laboratóriumnak a vizsgálat elvégzése előtt a vizsgálandó anyaggal kapcsolatos minden rendelkezésre álló információt figyelembe kell vennie. Ilyen információk az anyag megjelölése és kémiai szerkezete; fizikai-kémiai tulajdonságai; bármely más, az anyaggal elvégzett *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálat eredményei; szerkezetileg rokon anyagok toxikológiai adatai; valamint az anyag várható alkalmazása(i). Ezekre az információkra azért van szükség, hogy minden érintett meggyőződjön arról, hogy a vizsgálat releváns az emberi egészség védelme szempontjából, és elősegíti majd a legmegfelelőbb kezdődózis kiválasztását.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Akut orális toxicitás: a vizsgálandó anyag egyszeri vagy 24 órán belül többszöri dózisának szájon át történő beadását követően jelentkező káros hatások.

Késleltetett elhullás: egy állat 48 órán belül nem hull el vagy nem tűnik elhullásközeli állapotban lévőnek, de később, a 14 napos megfigyelési időszak során elpusztul.

Dózis: a vizsgálandó anyag beadott mennyisége. A dózist a vizsgálandó anyagnak a kísérleti állatok testtömegegységére számított tömegében (mg/kg) fejezik ki.

GHS: Globálisan harmonizált osztályozási rendszer vegyi anyagokhoz és keverékekhez. Az OECD (emberi egészség és környezet), az ENSZ Veszélyes Anyagok Szállításának Szakértői Bizottsága (fizikai-kémiai tulajdonságok) és az ILO (veszély nyilvánosságra hozatala) közös tevékenysége, amelyet a Szervezetek Közötti Program a Vegyi Anyagok Helyes Kezelésére (IOMC) koordinál.

Közeli elhullás: amikor a legközelebbi tervezett megfigyelés időpontja előtt elhullásközeli állapot kialakulása vagy elhullás várható. Rágcsálók esetében erre utaló jelek lehetnek a görcsök, az oldalhelyzet, a fekvőhelyzet és a remegés. (A további részleteket lásd a Humane Endpoints Guidance Documentben (9)).

LD_{50} (közepes letális orális dózis): a vizsgálandó anyag statisztikailag levezetett egyszeri olyan dózisa, amely orálisan beadva az állatok 50 %-ának elhullását okozza. Az LD_{50}-értéket a vizsgálandó anyagnak a kísérleti állatok testtömegegységére számított tömegében (mg/kg) fejezik ki.

Határdózis: egy, a vizsgálhatóság felső határánál lévő dózis (2 000 vagy 5 000 mg/kg).

Elhullásközeli állapot: az esetleges kezelés ellenére is elhullás közelében lévő állapot vagy túlélésre való képtelenség. (A további részleteket lásd a Humane Endpoints Guidance Documentben (9)).

Megjósolható elhullás: a kísérlet tervezett vége előtt, a jövőben egy ismert időpontban való elhullásra utaló klinikai tünetek megléte, például: a víz vagy az élelem elérésére való képtelenség. (A további részleteket lásd a Humane Endpoints Guidance Documentben (9)).

▼B

1.3. A VIZSGÁLAT ELVE

A vizsgálat alapelve, hogy a lépésenként minimális számú állatot alkalmazó lépcsőzetes eljárás alapján elegendő információ nyerhető a vizsgálandó anyag akut toxicitásáról ahhoz, hogy be lehessen azt sorolni. Az anyagot szájon át és a meghatározott dózisok egyikét alkalmazva adják be a kísérleti állatok egy csoportjának. Az anyagot lépcsőzetes eljárással vizsgálják, ahol minden lépésben három azonos ivarú (általában nőstény) állatot használnak. A kezelt állatokban az anyaggal összefüggő elhullás vagy annak hiánya határozza meg a következő lépést, azaz:

— nincs szükség további vizsgálatra,

— további három állat vizsgálata történik ugyanazzal a dózissal,

— további három állat vizsgálata történik a következő nagyobb vagy kisebb dózissal.

A vizsgálati eljárás további részletei az 1. függelékben találhatók. A módszer alkalmazásával döntést lehet hozni arról, hogy a vizsgálandó anyag a rögzített LD_{50}-határértékek segítségével megállapított toxicitási osztályok melyikébe sorolható be.

1.4. A MÓDSZER ISMERTETÉSE

1.4.1. **Az állatfaj kiválasztása**

A preferált rágcsálófaj a patkány, bár más rágcsálófajok is alkalmazhatók. Általában nőstényeket használnak (9). Ennek az az oka, hogy a hagyományos LD_{50}-vizsgálatokra vonatkozó szakirodalom áttekintése alapján általában kicsi a különbség a nemek érzékenysége között, de azokban az esetekben, amikor megfigyelhető különbség, a nőstények általában valamivel érzékenyebbek (11). Azonban ha a szerkezetileg rokon vegyületek toxikológiai vagy toxikokinetikai tulajdonságaival kapcsolatos adatok szerint a hímek nagyobb érzékenysége valószínűsíthető, akkor hímeket kell alkalmazni. Megfelelően meg kell indokolni, ha a vizsgálatot hímekkel végzik.

Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal felnőtt állatokat kell alkalmazni. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. Az adagolás megkezdésekor az állatoknak 8–12 hetesnek kell lenniük, és testtömegük nem térhet el ± 20 %-nál többel az esetlegesen korábban kezelt állatok testtömegének átlagától.

1.4.2. **Az állatok tartásának és etetésének körülményei**

A kísérleti állatokat 22 °C (± 3 °C) hőmérsékletű helyiségben kell tartani. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50 és 60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. Az állatokat lehet vizsgált dózisonként egy ketrecben tartani, de az egy ketrecben lévő állatok számát úgy kell megválasztani, hogy az ne zavarja az egyes állatok megfigyelését.

▼B

1.4.3. **Az állatok előkészítése**

Az állatokat véletlenszerűen kell kiválasztani, majd egyedi azonosítóval kell ellátni, és a kezelés megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben kell tartani őket, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez.

1.4.4. **A dózisok előkészítése**

A vizsgálandó anyagokat általában a vizsgálandó dózistartományon belül állandó térfogatban kell beadni úgy, hogy a dóziskészítmény koncentrációját változtatják. Ha azonban egy folyékony végterméket vagy keveréket vizsgálnak, a vizsgálatot követő kockázatértékelés szempontjából megfelelőbb lehet, ha a vizsgálandó anyagot hígítatlanul, azaz állandó koncentrációban alkalmazzák, illetve egyes hatóságok ezt írják elő. A maximálisan beadható dózistérfogatot azonban egyik esetben sem szabad túllépni. Az, hogy egyszerre maximálisan mekkora térfogatú folyadékot lehet beadni, a kísérleti állat méretétől függ. Rágcsálók esetében a térfogat általában nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömegarányt: vizes oldatok esetében azonban 2 ml/100 g testtömegarány is megfontolható. A dóziskészítmény formulázása tekintetében – ahol lehet – a vizes oldatok/szuszpenziók/emulziók alkalmazása javasolt, másodsorban az olajos (pl. kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatok/szuszpenziók/emulziók, és harmadsorban esetlegesen más vivőanyagokban elkészített oldatok. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. A dózisokat a beadás előtt rövid idővel kell elkészíteni, kivéve, ha ismert és igazoltan elfogadható a készítmény stabilitása az alatt az alkalmazás időtartama alatt.

1.5. ELJÁRÁS

1.5.1. **A dózisok beadása**

A vizsgálandó anyagot egyetlen dózisban, gyomorszondán vagy egy megfelelő intubációs kanülön át történő táplálással kell beadni. Abban a rendkívüli esetben, ha nem lehetséges egyetlen dózist alkalmazni, a dózis egy 24 órát nem meghaladó időtartam alatt kisebb részletekben is beadható.

A kezelés előtt az állatokat éheztetni kell (pl. patkány esetében egy éjszakán át meg kell vonni a táplálékot, de a vizet nem; egér esetében 3–4 órára kell megvonni a táplálékot, de a vizet nem). A koplaltatási időszakot követően meg kell mérni az állatok testtömegét, majd be kell adni a vizsgálandó anyagot. Az anyag beadása után a táplálékot újra meg lehet vonni –patkány esetében 3–4 órára, egér esetében 1–2 órára. Ha egy dózist részletekben adnak be, a beadás időtartamától függően menet közben szükség lehet arra, hogy az állatoknak táplálékot és vizet adjanak.

1.5.2. **Az állatok száma és a dózisok**

Minden lépésben három állatot kell alkalmazni. A kezdődózist az 5, 50, 300 és 2 000 mg/testtömeg-kg-os négy rögzített dózis közül kell kiválasztani. Azt a dózist kell kezdődózisként kiválasztani, amelyiknél a legvalószínűbb, hogy a kezelt állatok egy részénél elhullást okoz. Az 1. függelékben látható folyamatábrák ismertetik az egyes kezdődózisok esetén követendő eljárást. A 4. függelék pedig azzal kapcsolatosan ad iránymutatást, hogy a GHS bevezetéséig hogyan kell az EU-rendszer szerint elvégezni a besorolást.

▼B

Ha a rendelkezésre álló információ alapján a legmagasabb kezdődózis (2 000 mg/testtömeg-kg) valószínűleg nem okoz elhullást, akkor határérték-vizsgálatot kell végezni. Ha a vizsgálandó anyagról nincs információ, állatjóléti okokból a 300 mg/testtömeg-kg-os kezdődózis alkalmazása javasolt.

Az egyes dózisok vizsgálata közötti időtartamot a mérgezési tünetek megjelenésének időpontja, időtartama és súlyossága határozza meg. Az állatok következő dózissal történő kezelését nem szabad megkezdeni mindaddig, amíg meg nem győződnek arról, hogy az előzőleg kezelt állatok életben maradnak.

Kivételes esetben és kizárólag akkor, ha konkrét szabályozási hatósági követelmények indokolják, megfontolás tárgyává lehet tenni egy további, 5 000 mg/kg-os felső dózis alkalmazását (lásd a 2. függeléket). Az állatok kímélete érdekében a GHS 5. kategóriában (2 000–5 000 mg/kg) nem ajánlott állatokkal kísérletezni, és csak abban az esetben szabad ilyet tervezni, ha nagy a valószínűsége, hogy egy ilyen vizsgálat eredményei közvetlen jelenőséggel bírnak az emberi vagy állati egészség vagy a környezet védelme szempontjából.

1.5.3. **Határérték-vizsgálat**

Határérték-vizsgálatot elsősorban olyan helyzetekben kell végezni, ha a kísérletet végzőnek olyan információi vannak, amelyek szerint a vizsgálandó anyag valószínűleg nem toxikus, azaz csak a hatósági határértékdózisok felett toxikus. A vizsgálandó anyag toxicitásával kapcsolatban információ hasonló vegyületek vagy keverékek vagy termékek vizsgálataiból szerezhető, figyelembe véve a toxikológiai szempontból fontos komponenseket, illetve azok százalékos arányát. Olyan esetekben, ha kevés az anyag toxicitásával kapcsolatos információ, vagy egyáltalán nem áll rendelkezésre, vagy ha a vizsgálandó anyag várhatóan toxikus, a fő vizsgálatot kell elvégezni.

Végezhető határérték-vizsgálat egyetlen, 2 000 mg/testtömeg-kg-os dózissal, összesen hat (lépésenként három-három) állat alkalmazásával. Kivételes esetben végezhető határértékvizsgálat egyetlen, 5 000 mg/kg-os dózissal is, amikor összesen három állatot alkalmaznak (lásd a 2. függeléket). A vizsgálandó anyaggal összefüggő elhullás esetén szükséges lehet a következő alacsonyabb dózissal tovább folytatni a vizsgálatokat.

1.6. MEGFIGYELÉSEK

Az állatokat a dózis beadása után egyedileg kell megfigyelni, legalább az első 30 percben, azután az első 24 órában rendszeres időközönként, amelynek során különös figyelemmel kell őket kísérni az első 4 órában, majd ezt követően naponta, összesen 14 napon át, kivéve, ha az állatot állatjóléti okok miatt ki kell venni a vizsgálatból, és humánus módon exterminálni kell, vagy ha az állat elhullik. A megfigyelés időtartamát azonban nem szabad mereven meghatározni. Ezt a mérgezési reakciók, illetve a gyógyulás kezdete és időtartama alapján kell meghatározni, és ilyen módon szükség esetén meg lehet hosszabbítani. Fontos a mérgezési tünetek megjelenésének, illetve megszűnésének időpontja, különösen, ha a mérgezési tünetek inkább késleltetve jelentkeznek (12). Minden megfigyelést szisztematikusan rögzíteni kell úgy, hogy minden állat esetében önálló adatsort kell felvenni.

▼B

Ha a mérgezési tünetek tartósak, további megfigyelésekre van szükség. Meg kell figyelni a bőr és a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák, valamint a légzési és a keringési rendszer, az autonóm és a központi idegrendszer, illetve a szomatomotoros aktivitás és a viselkedési mintázatok változásait. Figyelemmel kell lenni remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma előfordulására is. A Humane Endpoints Guidance Documentben összefoglalt alapelveket és követelményeket is figyelembe kell venni (9). Humánus módon exterminálni kell az elhullásközeli állapotban lévő állatokat, illetve azokat, amelyek súlyos fájdalom vagy tartós szorongás jeleit mutatják. Ha az állatokat humánus okok miatt exterminálni kell, vagy elhullanak, a lehető legpontosabban fel kell jegyezni az elhullás időpontját is.

1.6.1. **Testtömeg**

Röviddel a vizsgálandó anyag beadása előtt és legalább egy héttel utána minden állat testtömegét egyenként meg kell mérni. A testtömegváltozást ki kell számítani, és rögzíteni kell. A vizsgálat végén az életben maradt állatokat újra meg kell mérni, majd humánus módon exterminálni kell őket.

1.6.2. **Kórbonctani vizsgálat**

Minden kísérleti állatot makroszkópos boncolásnak kell alávetni (azokat is, amelyek a vizsgálat során elpusztultak, vagy amelyeket állatjóléti okok miatt ki kellett venni a vizsgálatból). Minden egyes állat esetében minden makroszkópos kórtani elváltozást fel kell jegyezni. A kezdődózis beadása után legalább 24 óráig túlélő állatok esetében tervbe lehet venni a makroszkópos kórtani elváltozást mutató szervek mikroszkópos vizsgálatát is, mivel abból hasznos információk nyerhetők.

2. **ADATOK**

Az állatokra vonatkozóan egyedi adatsorokat kell felvenni. Emellett az összes adatot táblázatos formában is össze kell foglalni úgy, hogy minden vizsgálati csoportra vonatkozóan mutassa a csoportban lévő kísérleti állatok számát, valamint azoknak a számát, amelyeknél mérgezési tünetek láthatók, amelyek a vizsgálat során elhullottak, vagy amelyeket humánus módon exterminálták, az egyes állatok elhullásának időpontját, a toxikus hatások leírását, időbeli lefolyását és visszafordíthatóságát, valamint a boncolások eredményeit.

3. **JELENTÉS**

3.1. **Vizsgálati jelentés**

A vizsgálati jelentésnek megfelelő módon a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

— fizikai megjelenés, tisztaság és ha releváns, a fizikai-kémiai tulajdonságok (ezen belül az izomerizáció is),

— azonosító adatok, ezen belül a CAS-szám.

Vivőanyag (ha szükséges):

— ha a vivőanyag nem víz, akkor ennek indoklása.

Kísérleti állatok:

— az alkalmazott faj/törzs,

▼B

— az állatok mikrobiológiai státusza, feltéve, hogy ismert,

— az állatok száma, életkora és ivara (ezen belül adott esetben annak indoklása, hogy nőstények helyett miért hímeket alkalmaztak),

— az állatok származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.

Kísérleti körülmények:

— a vizsgálandó anyag formulázására vonatkozó információk, ezen belül a beadott anyag fizikai formájával kapcsolatos adatok,

— a vizsgálandó anyag beadására vonatkozó információk, ezen belül a beadott térfogat és a beadás időpontja,

— a táplálék és a víz minősége (ezen belül a takarmány típusa/forrása, a víz forrása),

— a kezdődózis kiválasztásának indoklása.

Eredmények:

— a válaszadatok és a dózisok táblázatos formában történő megadása minden egyes állatra vonatkozóan (azaz a mérgezési tüneteket mutató, ezen belül elhullt állatokra; a hatások jellege, súlyossága és időtartama),

— a testtömegadatok és a testtömegváltozások táblázatos formában történő megadása,

— az egyes állatok testtömege a dózis beadásának napján, azt követően hetente, valamint az elhullás vagy exterminálás időpontjában,

— a tervezett exterminálás előtti elhullás napja és ideje,

— a mérgezési tünetek megjelenése és időbeli lefolyása, valamint esetleges visszafordíthatósága minden egyes állatra vonatkozóan,

— a boncolások és adott esetben a kórszövettani vizsgálatok eredményei minden egyes állatra vonatkozóan.

Az eredmények diszkussziója és értelmezése.

Következtetések.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(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 LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.

(8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FRF.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 LD50, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. Principles and Methods of Toxicology. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

1. FÜGGELÉK

AZ EGYES KEZDŐDÓZISOK ESETÉBEN KÖVETENDŐ ELJÁRÁS

ÁLTALÁNOS MEGJEGYZÉSEK

Minden egyes kezdődózis esetén az ebben a függelékben bemutatott megfelelő vizsgálati sémák határozzák meg a követendő eljárást.

— 1A. függelék: a kezdődózis 5 mg/testtömeg-kg,

— 1B. függelék: a kezdődózis 50 mg/testtömeg-kg,

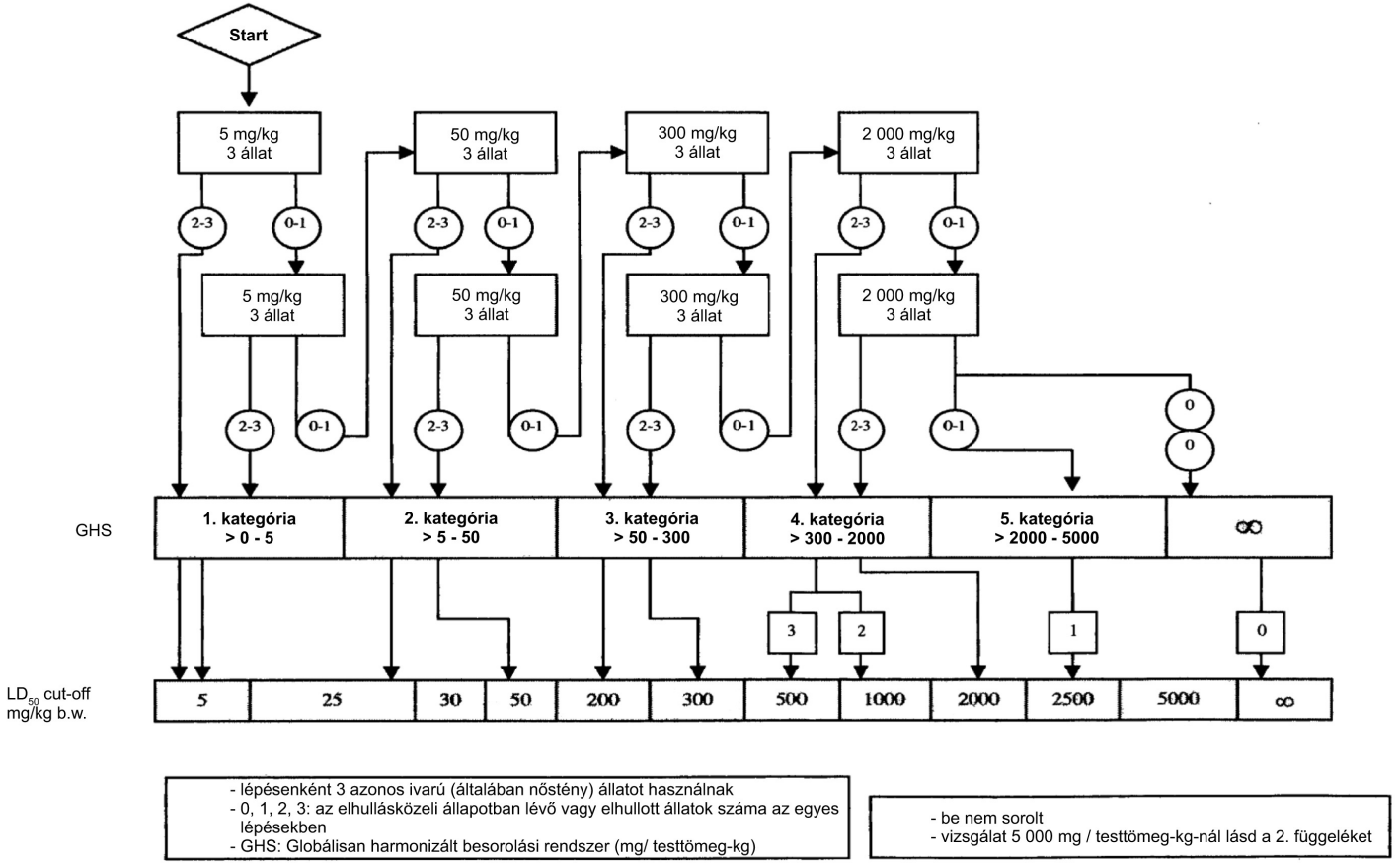
— 1C. függelék: a kezdődózis 300 mg/testtömeg-kg,

— 1D. függelék: a kezdődózis 2 000 mg/testtömeg-kg.

A humánus módon exterminált vagy elhullott állatok számától függően a vizsgálati eljárás a jelzett nyilakat követi

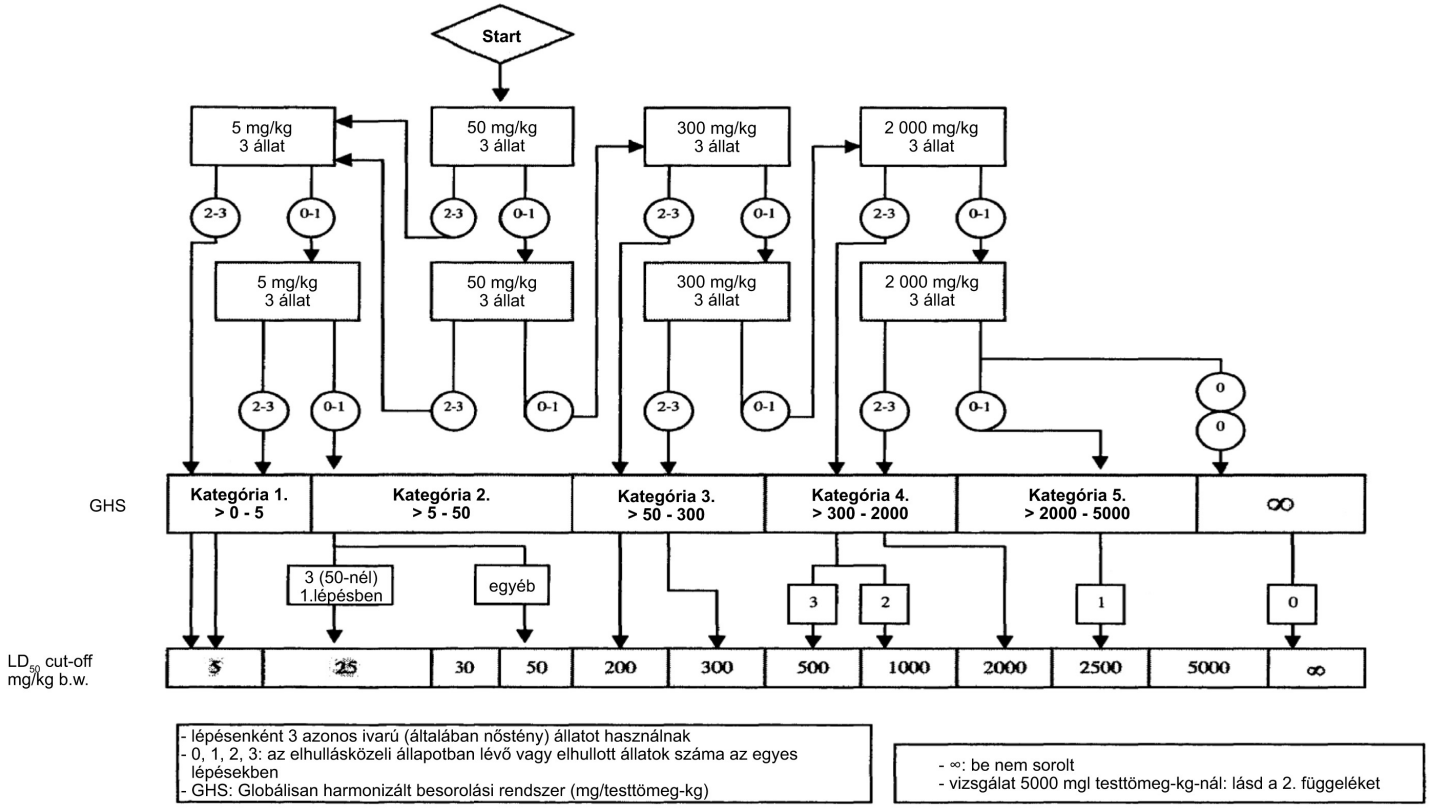
1A. FÜGGELÉK

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS 5 MG/TESTTÖMEG-KG KEZDŐDÓZIS ESETÉN



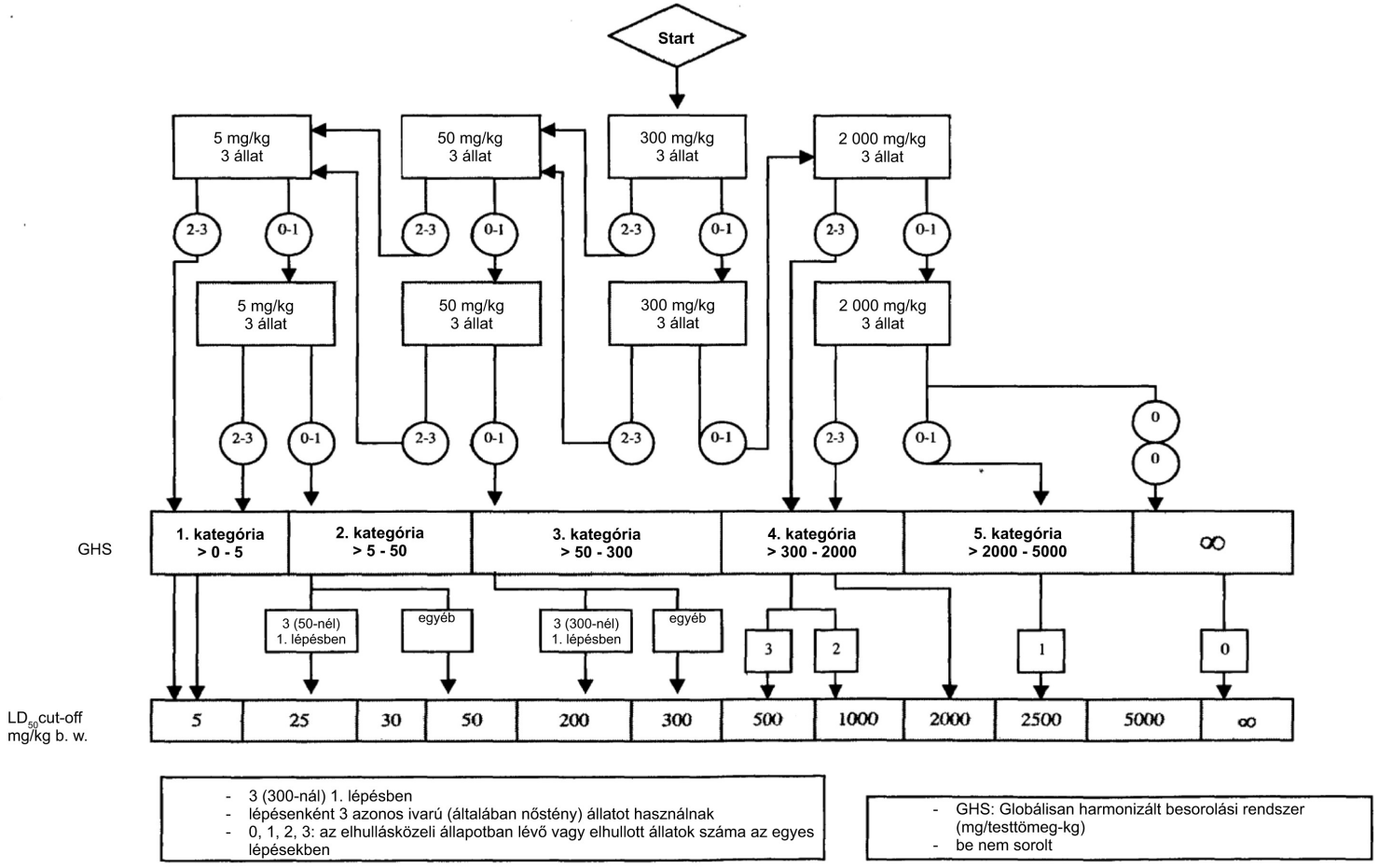
1B. Függelék

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS 50 MG/TESTTÖMEG-KG KEZDŐDÓZIS ESETÉN



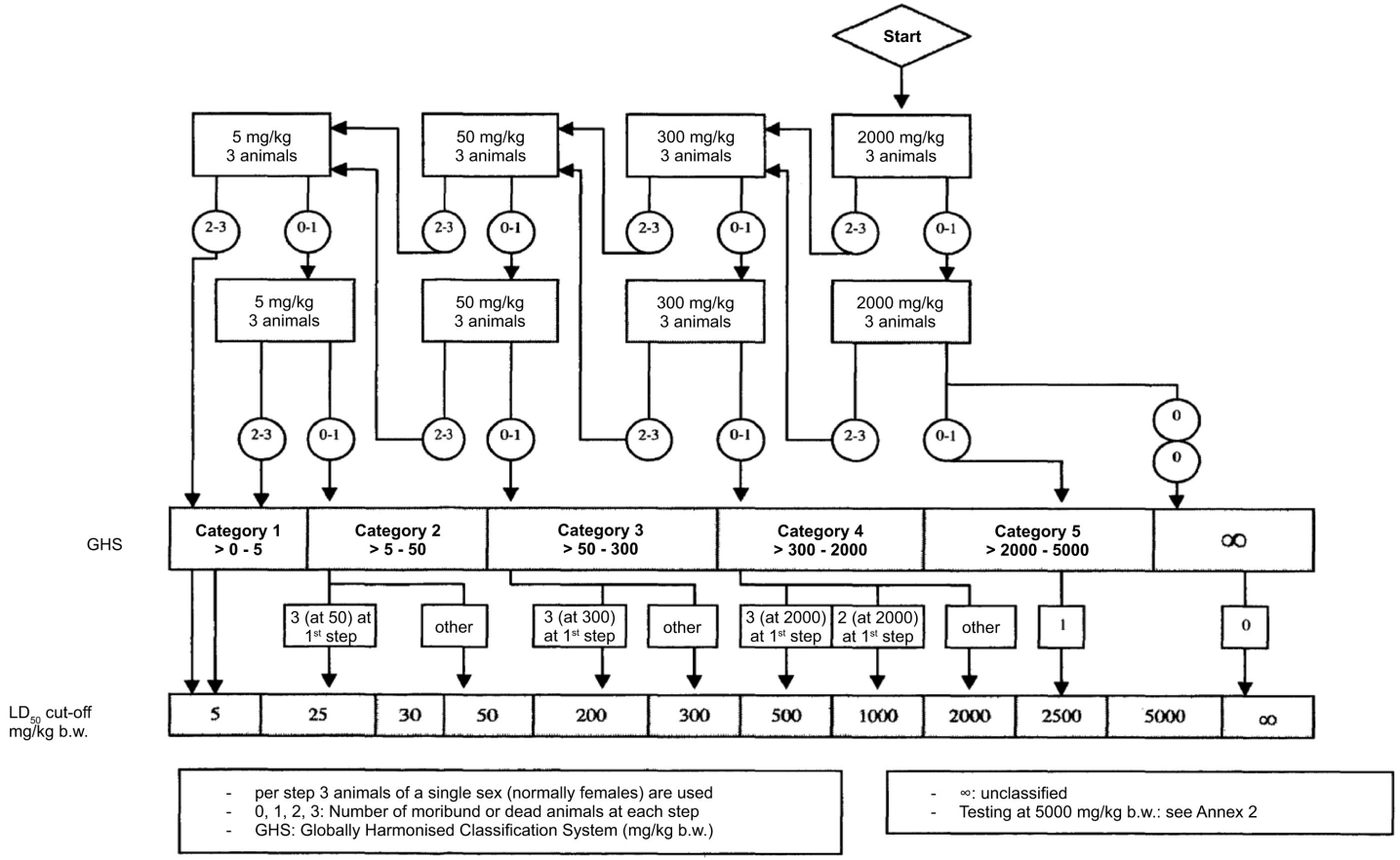
1C. FÜGGELÉK

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS 300 MG/TESTTÖMEG-KG KEZDŐDÓZIS ESETÉN



1D. FÜGGELÉK

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS 2 000 MG/TESTTÖMEG-KG KEZDŐDÓZIS ESETÉN



▼B

2. FÜGGELÉK

A VÁRHATÓAN 2 000 MG/KG FELETTI LD_{50}-ÉRTÉKKEL RENDELKEZŐ VIZSGÁLANDÓ ANYAGOK VIZSGÁLATOK NÉLKÜLI OSZTÁLYOZÁSÁNAK KRITÉRIUMAI

Az 5. veszélyességi kategória kritériumait úgy állapították meg, hogy tegyék lehetővé azoknak a vizsgálandó anyagoknak a meghatározását, amelyek akut toxicitási kockázata viszonylag alacsony, de bizonyos körülmények között veszélyt jelenthetnek az érzékeny populációkra. Az ilyen anyagok orális vagy dermális LD_{50}-értéke várhatóan 2 000 és 5 000 mg/kg közötti tartományban található, vagy ezzel egyenértékű dózisoknak megfelelő az egyéb beadási módok esetében. A vizsgálandó anyagokat az alábbi esetekben kell a 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg veszélyességi kategóriába (GHS 5. kategória) sorolni:

a) ha az 1A–1D. függelékben bemutatott, az elhullási gyakoriságon alapuló vizsgálati sémák bármelyike szerint ebbe a kategóriába kell sorolni;

b) ha hitelt érdemlő bizonyíték van már arra, hogy az anyag LD_{50}-értéke az 5. kategóriában megadott tartományba esik; vagy más állatkísérletek vagy humán toxikus hatások szerint a humán egészségügyi veszély akut jellegű;

c) adatok extrapolálásával, becslésével vagy mérésével, ha egy veszélyesebb osztályba való besorolás nem indokolt, és

   — hitelt érdemlő információk emberben jelentős toxikus hatásokra utalnak, vagy

   — a legfeljebb 4. kategóriának megfelelő értékekkel elvégzett orális beadási móddal történő vizsgálatok során elhullás történt, vagy

   — ha a legfeljebb 4. kategóriának megfelelő értékekkel elvégzett vizsgálat alapján a szakértők véleménye megerősíti a toxicitás szignifikáns klinikai tüneteit, kivéve a hasmenést, szőrmeredezést vagy gondozatlan megjelenést, vagy

   — ha a szakértők véleménye megerősíti azokat a hitelt érdemlő információkat, amelyek más állatkísérletekben tapasztalt szignifikáns akut hatásokat valószínűsítenek.

2 000 MG/KG FELETTI DÓZISOKKAL TÖRTÉNŐ VIZSGÁLAT

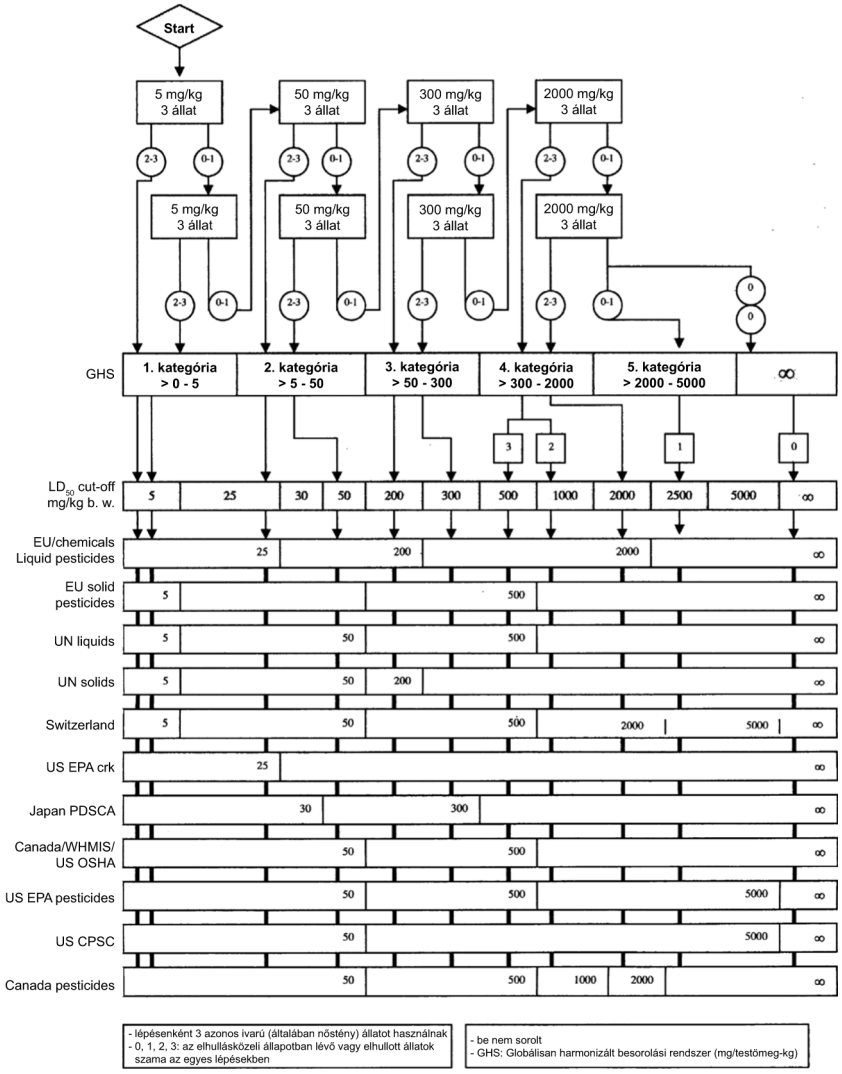
Az állatok jólétének védelme iránti igényt elismerve nem ajánlott, hogy állatokat az 5. kategória tartományában (5 000 mg/kg) vizsgálják, és csak akkor szabad fontolóra venni, ha nagy a valószínűsége, hogy az ilyen vizsgálatok eredményei közvetlen jelentőséggel bírnak az állati vagy emberi egészség védelme szempontjából (10). Nem szabad további vizsgálatokat végezni ennél magasabb dózisokkal.

Ha vizsgálatot kell végezni, csak egy lépés (azaz három állat), az 5 000 mg/kg-os dózis alkalmazása szükséges. Ha az első kezelt állat elhullik, akkor az 1. függelékben bemutatott folyamatábrának megfelelően a kezelést a 2 000 mg/kg-os dózissal kell folytatni. Ha az első állat életben marad, két további állatot kell kezelni. Ha a három állat közül csak egy hullik el, az LD_{50}-érték várhatóan meghaladja az 5 000 mg/kg-ot. Ha mindkét állat elhullik, akkor a vizsgálatot a 2 000 mg/kg-os dózissal kell folytatni.

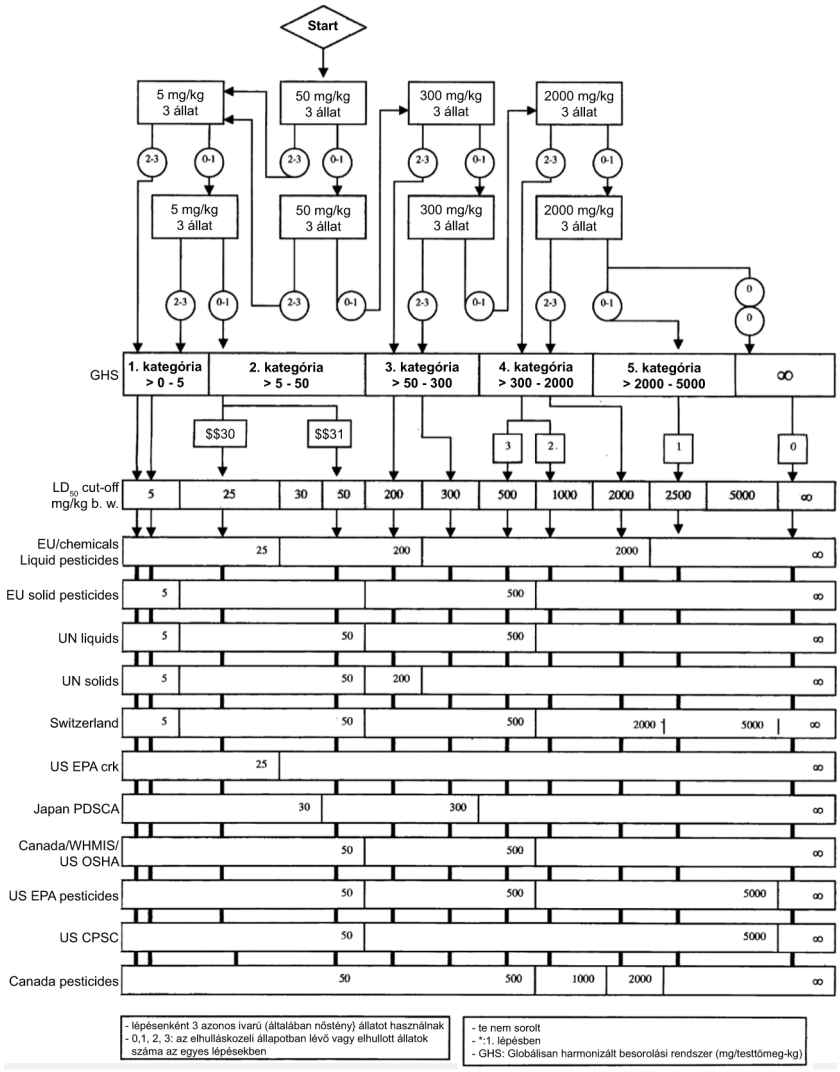
▼B

3. FÜGGELÉK

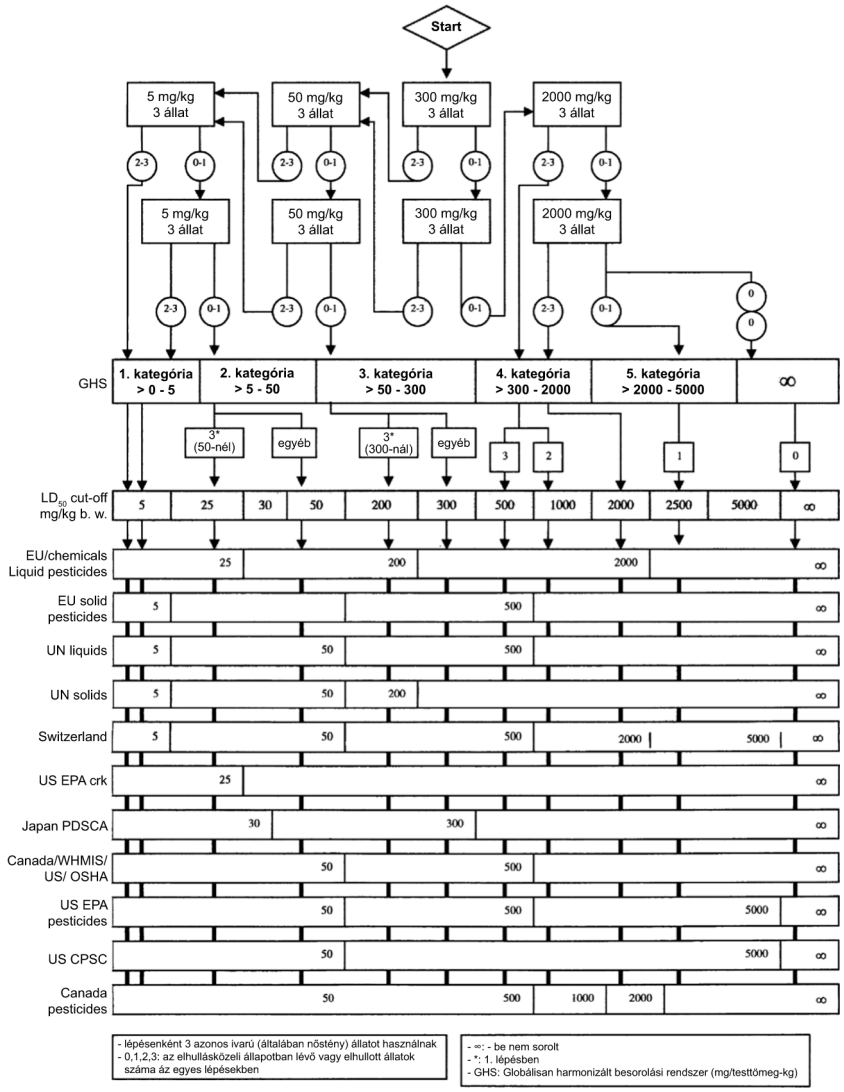
B1c. VIZSGÁLATI MÓDSZER: Útmutató az EU-rendszer szerinti besoroláshoz a Globálisan harmonizált osztályozási rendszer (GHS) teljes körű bevezetéséig tartó átmeneti időszakban (a (8) hivatkozásból)



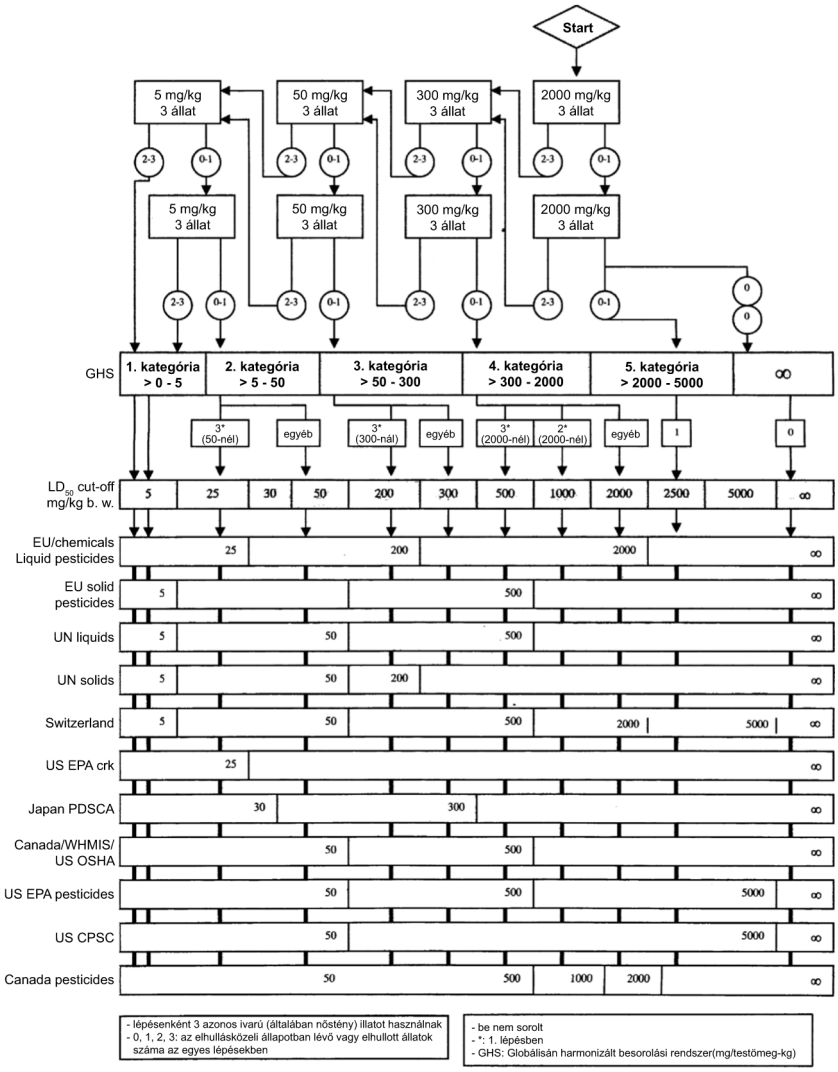
▼B


Start
5 mg/kg 3 állat
50 mg/kg 3 állat
300 mg/kg 3 állat
2000 mg/kg 3 állat
2-3
0-1
0
GHS
1. kategória > 0 - 5
2. kategória > 5 - 50
3. kategória > 50 - 300
4. kategória > 300 - 2000
5. kategória > 2000 - 5000
∞
$$30
$$31
LD50 cut-off mg/kg b. w.
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
EU/chemicals Liquid pesticides
EU solid pesticides
UN liquids
UN solids
Switzerland
US EPA crk
Japan PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticides
US CPSC
Canada pesticides
- lépésenként 3 azonos ivarú (általában nőstény) állatot használnak
- 0,1, 2, 3: az elhullásközeli állapotban lévő vagy elhullott állatok száma az egyes lépésekben
- te nem sorolt
- *:1. lépésben
- GHS: Globálisan harmonizált besorolási rendszer (mg/testtömeg-kg)

▼B


Start
5 mg/kg 3 állat
50 mg/kg 3 állat
300 mg/kg 3 állat
2000 mg/kg 3 állat
2-3
0-1
0
GHS
1. kategória > 0 - 5
2. kategória > 5 - 50
3. kategória > 50 - 300
4. kategória > 300 - 2000
5. kategória > 2000 - 5000
∞
3* (50-nél)
egyéb
3* (300-nál)
3
2
1
LD50 cut-off mg/kg b. w.
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
EU/chemicals Liquid pesticides
EU solid pesticides
UN liquids
UN solids
Switzerland
US EPA crk
Japan PDSCA
Canada/WHMIS/ US/ OSHA
US EPA pesticides
US CPSC
Canada pesticides
- lépésenként 3 azonos ivarú (általában nőstény) állatot használnak
- 0,1,2,3: az elhullásközeli állapotban lévő vagy elhullott állatok száma áz egyes lépésekben
- ∞: - be nem sorolt
- *: 1. lépésben
- GHS: Globálisan harmonizált besorolási rendszer (mg/testtömeg-kg)

▼B


Start
5 mg/kg 3 állat
50 mg/kg 3 állat
300 mg/kg 3 állat
2000 mg/kg 3 állat
2-3
0-1
0
GHS
1. kategória > 0 - 5
2. kategória > 5 - 50
3. kategória > 50 - 300
4. kategória > 300 - 2000
5. kategória > 2000 - 5000
∞
3* (50-nél)
egyéb
3* (300-nál)
3* (2000-nél)
2* (2000-nél)
1
LD50 cut-off mg/kg b. w.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/chemicals Liquid pesticides
EU solid pesticides
UN liquids
UN solids
Switzerland
US EPA crk
Japan PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticides
US CPSC
Canada pesticides
- lépésenként 3 azonos ivarú (általában nőstény) állatot használnak
- 0, 1, 2, 3: az elhullásközeli állapotban lévő vagy elhullott állatok száma az egyes lépésekben
- be nem sorolt
- *: 1. lépésben
- GHS: Globálisán harmonizált besorolási rendszer(mg/testömeg-kg)

▼M4

B.2. AKUT INHALÁCIÓS TOXICITÁS

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 403. vizsgálati iránymutatásban (2009) (1) leírt módszerrel. Az akut inhalációs toxicitásra vonatkozó eredeti 403. vizsgálati iránymutatást 1981-ben fogadták el. A jelen felülvizsgált B.2. vizsgálati módszert (a felülvizsgált 403. vizsgálati iránymutatás megfelelőjeként) a nagyobb rugalmasságot, az állatkísérletek csökkentését és a szabályozási igények kielégítését szem előtt tartva dolgozták ki. A felülvizsgált vizsgálati módszer kétféle tanulmányt foglal magában: egy hagyományos LC_{50}-protokollt és egy koncentráció x idő (C x t) protokollt. E vizsgálati módszer fő jellemzői, hogy alkalmas a nem halálostól a halálos kimenetelig terjedő koncentráció-hatás összefüggésnek a medián halálos koncentráció (LC_{50}), a nem halálos küszöbérték-koncentráció (például LC01) és a meredekség levezetése érdekében történő meghatározására, valamint a nemek szerint esetlegesen eltérő érzékenység megállapítására. A C x t protokoll abban az esetben alkalmazandó, ha meghatározott szabályozási vagy tudományos igény miatt, így többek között veszélyhelyzeti intézkedések tervezéséhez (például akut expozíciós iránymutatási szintek [AEGL], vészhelyzeti intézkedési tervezési iránymutatások [ERPG] vagy akut expozíciós küszöbértékek [AETL] levezetéséhez) vagy területrendezési célból van szükség több időtartamon át végzett állatkísérletekre.

2. A jelen vizsgálati módszer szerinti vizsgálatok végrehajtásával és értelmezésével kapcsolatos útmutatás az akut inhalációs toxicitási vizsgálatokra vonatkozó (39. számú) iránymutatásban (2) található.

3. Az e vizsgálati módszer összefüggésében alkalmazott fogalmak meghatározása a jelen fejezet végén, valamint a 39. iránymutatásban (2) található.

4. Ez a vizsgálati módszer lehetővé teszi a vizsgált vegyi anyag jellemzését és mennyiségi kockázatértékelését, valamint a vizsgált anyagoknak az 1272/2008/EK rendelet (3) szerinti rangsorolását és osztályozását. A megfelelő vizsgálati módszer akut hatások vizsgálatához történő kiválasztásához a 39. iránymutatásban (2) található útmutatás. Ha csak osztályozással és címkézéssel kapcsolatos információk szükségesek, általában e melléklet B.52. fejezetét (4) javasolt alkalmazni (lásd a 39. iránymutatást (2)). A jelen B.2. vizsgálati módszer nem kifejezetten különleges anyagok – például alacsony oldhatóságú izometrikus vagy rostos anyagok, illetve mesterséges nanoanyagok – vizsgálatára szolgál.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

5. A jelen vizsgálati módszer szerinti vizsgálatok elvégzésének mérlegelése előtt a vizsgálati laboratóriumnak az állatkísérletek minimalizálása érdekében figyelembe kell vennie a vizsgált vegyi anyagról rendelkezésre álló összes információt, beleértve az olyan meglévő tanulmányokat (például az e melléklet B.52. fejezetében (4) leírtakat), amelyek adatai a további vizsgálatok elvégzésének mellőzését támasztják alá. A legalkalmasabb faj, törzs, nem, expozíciós mód és a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztását esetlegesen segítő információk közé tartozik a vizsgált vegyi anyag azonossága, kémiai szerkezete, valamint fizikai és kémiai tulajdonságai, az esetleges *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei, a várható felhasználási területek és a humán expozíció lehetősége, a szerkezetileg rokon anyagokról rendelkezésre álló (Q)SAR- és toxikológiai adatok (lásd a 39. iránymutatást (2)).

▼M4

6. Amennyire csak lehet, kerülendő a maró vagy irritáló hatású vegyi anyagok olyan koncentrációban történő vizsgálata, amely előreláthatóan súlyos fájdalmat és/vagy szorongást okozna. Annak megállapítása érdekében, hogy a további vizsgálatoktól el lehet-e tekinteni, szakértői megítélés alapján értékelni kell a lehetséges maró, illetve irritáló hatást, olyan bizonyítékokra támaszkodva, mint az embereknél és állatoknál (például nem maró, illetve nem irritáló koncentráció mellett ismételt dózisokkal végzett vizsgálatok során) tapasztalt hatások, meglévő *in vitro* adatok (például az e melléklet B.40. (5) és B.40A. fejezetében (6) vagy az OECD 435. vizsgálati iránymutatásában (7) leírtak), pH-értékek, hasonló anyagokra vonatkozó adatok vagy bármely egyéb kapcsolódó adat. A jelen vizsgálati módszer meghatározott szabályozási igények esetén (például vészhelyzeti tervezési célokból) alkalmazható állatok ilyen anyagoknak való expozíciójára, mivel a vizsgálatvezető vagy a vezető kutató számára irányítást biztosít a célkoncentrációk kiválasztása felett. A célkoncentrációk azonban nem okozhatnak súlyos irritáló, illetve maró hatást, ugyanakkor elegendőnek kell lenniük ahhoz, hogy a koncentráció-hatás görbét a vizsgálat szabályozási és tudományos céljának megfelelő szintekre kiterjesszék. Ezeket a koncentrációkat eseti alapon kell kiválasztani, és a választást indokolni kell (lásd a 39. iránymutatást (2)).

A VIZSGÁLAT ELVE

7. A jelen felülvizsgált B.2. vizsgálati módszert a vizsgált vegyi anyag akut toxicitására vonatkozó elegendő, az anyag osztályozását lehetővé tevő információ megszerzése, valamint a mennyiségi kockázatértékelés elvégzéséhez szükséges, az egyik vagy mindkét nemre vonatkozó letalitási adatok (például LC_{50}, LC_{01} és meredekség) biztosítása érdekében dolgozták ki. A vizsgálati módszer két módszert foglal magában. Az első egy hagyományos protokoll, amelynek során állatok csoportjait tesszük ki egy határkoncentrációnak (határérték-vizsgálat) vagy fokozatosan növekedő koncentrációk sorozatának előre meghatározott, általában 4 órás időtartamra. Meghatározott szabályozási célok elérése érdekében más expozíciós időtartamok is alkalmazhatók. A másik módszer egy (C x t) protokoll, amelynek során állatok csoportjait tesszük ki egy határkoncentrációnak vagy fokozatosan növekedő koncentrációk sorozatának több időtartamon keresztül.

8. Az elhullásközeli állapotban lévő, nyilvánvalóan fájdalmakkal küszködő vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutató állatokat humánus módon el kell pusztítani, és a vizsgálat eredményeinek értelmezésekor a vizsgálat során elhullott állatokkal azonos módon kell figyelembe venni. A megjósolható vagy közeli elhullás felismerését segítő iránymutatás, valamint az elhullás közelében lévő vagy súlyosan szenvedő állatok elpusztítására vonatkozó döntési kritériumok a humánus végpontokról szóló 19. OECD-iránymutatásban (8) találhatók.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

9. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal, ivarérett állatokat kell alkalmazni. A javasolt állatfaj a patkány, más faj használata esetén a döntést indokolni kell.

Az állatok előkészítése

10. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. Az expozíció napján az állatoknak 8–12 hetes fiatal, ivarérett egyedeknek kell lenniük, a testsúlyuk pedig a korábbi expozíciókkal érintett, azonos életkorú állatok nemenkénti átlagos testsúlyától legfeljebb ± 20 %-kal térhet el. Az állatokat véletlenszerűen kell kiválasztani, és egyedi azonosítás céljából meg kell jelölni. Az állatokat a laboratóriumi körülményekhez való szoktatás céljából a vizsgálat megkezdése előtt legalább 5 napig tartsuk a ketrecükben. Az állatokat a vizsgálatot megelőzően rövid ideig szoktatni kell a vizsgálati eszközökhöz, mivel ezzel csökkenthető az új környezet okozta stressz.

▼M4

Az állatok tartása

11. A kísérleti állatok tartására használt helyiség hőmérséklete 22 ± 3 °C kell, hogy legyen. A relatív páratartalmat ideális esetben 30–70 %-os tartományban kell tartani, ugyanakkor ez nem feltétlenül lehetséges, ha vivőanyagként vizet használunk. Az expozíció előtt és után az állatokat általában nemek és koncentrációk szerinti csoportokban kell a ketreceikben elhelyezni, azonban az állatok ketrecenkénti számának nem szabad akadályoznia az egyes állatok megfigyelését, és minimalizálnia kell a kannibalizmus és a marakodás okozta veszteségeket. Ha az állatok expozíciója csak orron át történik, szükséges lehet szoktatni azokat a lefogásukra szolgáló csövekhez. Az állatok lefogására szolgáló csövek nem okozhatnak az állatoknak indokolatlan fizikai, termális vagy a mozgásképtelenség okozta stresszt. A lefogás hatással lehet olyan fiziológiai végpontokra, mint a testhőmérséklet (hipertermia) és/vagy a percenkénti légzésvolumen. Amennyiben a rendelkezésre álló általános adatok azt igazolják, hogy ilyen változások nem lépnek fel számottevő mértékben, az állatok lefogására szolgáló csövekhez való előzetes szoktatás mellőzhető. Az aeroszoloknak egész testfelületükön kitett állatokat az expozíció során külön ketrecben kell elhelyezni, hogy a vizsgált aeroszol ne szűrődhessen át a többi állat szőrzetén. Hagyományos és minősített laboratóriumi takarmány alkalmazható – kivéve az expozíció időtartama alatt –, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást.

Inhalációs kamrák

12. Az inhalációs kamra kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált vegyi anyag jellegét és a vizsgálat célját. Az előnyben részesítendő expozíciós mód a csak orron keresztüli expozíció (ez magában foglalja a csak a fejet, orrot vagy szájat érintő expozíciót). A csak orron keresztüli expozíció általában előnyben részesítendő a folyékony vagy szilárd aeroszolok, valamint a lecsapódva esetlegesen aeroszolt alkotó gőzök vizsgálata esetén. Előfordulhat, hogy a vizsgálat különleges céljai egész testfelületen keresztüli expozíció alkalmazásával hatékonyabban elérhetők, ezt azonban indokolni kell a vizsgálati jegyzőkönyvben. Egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamra használata esetén a légköri stabilitás biztosítása érdekében a vizsgált állatok össztérfogata nem haladhatja meg a kamra térfogatának 5 %-át. A csak orron át történő és az egész testfelületen keresztüli expozíciós technikák elveit, valamint azok különös előnyeit és hátrányait a 39. iránymutatás (2) ismerteti.

EXPOZÍCIÓS KÖRÜLMÉNYEK

A koncentrációk beadása

13. Csak orron át történő expozíció esetén az expozíció időtartama patkányoknál 6 óráig terjedhet. Egerek csak orron át történő expozíciója esetén az expozíciós időtartam általában nem haladhatja meg a 4 órát. Amennyiben hosszabb vizsgálati időtartam szükséges, a döntést indokolni kell (lásd a 39. iránymutatást (2)). Az egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamrában aeroszoloknak kitett állatokat külön ketrecben kell tartani, hogy az állatok egymás tisztogatása során ne nyelhessék le a vizsgált vegyi anyagot. Az expozíció időtartama alatt az állatok nem kaphatnak takarmányt. Az állatoknak víz az egész testfelületen keresztüli expozíció teljes időtartama alatt adható.

14. Az állatokat gáz, gőz, aeroszol vagy ezek keveréke formájában tesszük ki a vizsgált vegyi anyagnak. A vizsgálandó halmazállapot a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, a kiválasztott koncentrációtól és/vagy a vizsgált vegyi anyag kezelése és használata során legnagyobb valószínűséggel előforduló halmazállapottól függ. A higroszkopikus és kémiailag reakcióképes vizsgált vegyi anyagokat száraz levegős körülmények között kell vizsgálni. Ügyelni kell a robbanékony koncentrációk keletkezésének elkerülésére.

▼M4

Részecskeméret-eloszlás

15. Minden aeroszol, valamint a lecsapódva esetlegesen aeroszolt alkotó gőzök esetén részecskeméretezést kell végezni. A légzőrendszer összes lényeges részének expozíciója érdekében 1 és 4 μm közötti tömegfelező aerodinamikai átmérővel (MMAD) rendelkező, az 1,5 és 3,0 közötti tartományba eső geometriai szórású (σ_g) aeroszolok használata javasolt (2) (9) (10). Habár ésszerű keretek között törekedni kell az e szabványnak való megfelelésre, szakértői megítélésre kell hagyatkozni, ha erre nincs lehetőség. A fémgőzök részecskéi például kisebbek lehetnek e szabványos méretnél, míg a töltéssel rendelkező részecskék, a rostok és a higroszkopikus anyagok (amelyek részecskeméretе a légzőrendszer nedves környezetében nő) meghaladhatják azt.

A vizsgált vegyi anyag előkészítése vivőanyagban

16. A vizsgált vegyi anyag megfelelő légköri koncentrációjának és részecskeméretének eléréséhez vivőanyag alkalmazható. Főszabályként a víz részesítendő előnyben. A részecskéket képző anyagok mechanikai eljárásoknak vethetők alá a szükséges részecskeméret-eloszlás elérése érdekében, ugyanakkor ügyelni kell arra, hogy a vizsgált vegyi anyag ne induljon bomlásnak és ne módosuljon. Amennyiben úgy véljük, hogy a mechanikai folyamatok (például a túlzott őrlésből adódó súrlódás miatt kialakult szélsőséges hőmérséklet) megváltoztatták a vizsgált vegyi anyag összetételét, a vizsgált vegyi anyag összetételét analitikai úton ellenőrizni kell. Kellő figyelmet kell fordítani a vizsgált vegyi anyag szennyeződésének elkerülésére. A nem morzsálódó, szándékosan belélegezhetetlen összetétellel készült szemcsés anyagokat nem szükséges vizsgálni. Kopásvizsgálattal kell igazolni, hogy a szemcsés anyag kezelése során nem keletkeznek belélegezhető részecskék. Ha a kopásvizsgálat során belélegezhető anyagok keletkezését észleljük, inhalációs toxicitási vizsgálatot kell végezni.

Kontrollállatok

17. Negatív (levegővel kezelt) kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata nem szükséges. Amennyiben a vizsgálati légkör létrehozása során víztől eltérő vivőanyagot alkalmazunk, vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportra csak akkor van szükség, ha nem állnak rendelkezésre múltbeli inhalációs toxicitási adatok. Ha a vivőanyaggal kevert vizsgált vegyi anyag a toxicitási vizsgálat alapján nem bizonyul toxikusnak, a vizsgált koncentráció mellett a vivőanyag sem tekintendő toxikusnak, tehát nincs szükség vivőanyaggal kezelt kontrollra.

AZ EXPOZÍCIÓS KÖRÜLMÉNYEK NYOMON KÖVETÉSE

Kamrabeli légáramlás

18. A kamrán keresztüli légáramlást gondosan szabályozni kell, folyamatosan nyomon kell követni, és minden expozíció során legalább óránként fel kell jegyezni. A vizsgálati légköri koncentráció (vagy stabilitás) nyomon követése valamennyi dinamikus paraméter globális mérését jelenti, és közvetett lehetőséget nyújt a légkör előállítása szempontjából lényeges összes dinamikus paraméter szabályozására. Különös figyelmet kell fordítani a csak orron át történő expozícióra szolgáló kamrában az újbóli belélegzés elkerülésére, amennyiben az expozíciós rendszeren keresztüli légáramlás nem elegendő a vizsgált vegyi anyagot tartalmazó légkör dinamikus áramlásának biztosítására. Előírt módszerek állnak rendelkezésre annak igazolására, hogy a választott működési körülmények között nem történik újbóli belélegzés (2) (11). Az oxigénkoncentrációnak legalább 19 %-nak kell lennie, a szén-dioxid-koncentráció pedig legfeljebb 1 % lehet. Amennyiben bármilyen okból feltételezhető, hogy ezek a szabványok nem teljesíthetők, az oxigén- és szén-dioxid-koncentrációt mérni kell.

▼M4

A kamra hőmérséklete és relatív páratartalma

19. A kamra hőmérsékletét 22 ± 3 °C-on kell tartani. Az állatok belégzési zónájában fennálló relatív páratartalmat a csak orron át történő és az egész testfelületen keresztüli expozíció esetén egyaránt nyomon kell követni, és legfeljebb 4 órás időtartamú expozíciók esetén legalább háromszor, rövidebb időtartamok esetén pedig óránként fel kell jegyezni. A relatív páratartalmat ideális esetben 30–70 %-os tartományban kell tartani, ugyanakkor előfordulhat, hogy ez vagy nem érhető el (például vízalapú keverékek vizsgálata esetén), vagy nem mérhető a vizsgált vegyi anyag vizsgálati módszerrel való interferenciája miatt.

Vizsgált vegyi anyag: névleges koncentráció

20. Az expozíciós kamrában fennálló névleges koncentrációt lehetőség szerint ki kell számítani és fel kell jegyezni. A névleges koncentrációt úgy kapjuk meg, hogy az előállított vizsgált vegyi anyag tömegét elosztjuk a kamrarendszeren áthaladt levegő össztérfogatával. A névleges koncentráció nem az állatok expozíciójának jellemzésére szolgál, ugyanakkor a névleges és a tényleges koncentráció összehasonlításával megismerhető a vizsgálati rendszer előállítási hatásfoka, és így feltárhatók az előállítással összefüggő problémák.

Vizsgált vegyi anyag: tényleges koncentráció

21. A tényleges koncentráció a vizsgált vegyi anyagnak az inhalációs kamrán belül, az állatok belégzési zónájában fennálló koncentrációját jelenti. A tényleges koncentráció specifikus módszerekkel (például közvetlen mintavétellel, adszorpciós vagy kémiai reakcióképességet vizsgáló módszerekkel, valamint utólagos analitikai jellemzéssel), vagy nem specifikus módszerekkel, például gravimetriai szűrőelemzéssel határozható meg. A gravimetriai elemzés csak egykomponensű por alakú aeroszolok, illetve alacsony illékonyságú folyadékok aeroszoljai esetén elfogadható, és alkalmazását a vizsgált vegyi anyag megfelelő, a vizsgálat előtt végzett jellemzésével kell alátámasztani. A gravimetriai elemzés a többkomponensű por alakú aeroszolok koncentrációjának meghatározására szintén alkalmazható. Ebben az esetben azonban analitikai adatokkal kell alátámasztani, hogy a levegőben lévő anyag összetétele hasonló a kiindulási anyagéhoz. Amennyiben ilyen információ nem áll rendelkezésre, a (lehetőleg levegőben lebegő) vizsgált vegyi anyag rendszeres időközönként végzett újbóli elemzésére lehet szükség a vizsgálat során. Olyan aeroszolizálódott ágensek esetén, amelyek elpárologhatnak vagy szublimálhatnak, igazolni kell, hogy mindegyik fázisból a választott módszerrel vettünk mintát. A cél-, a névleges és a tényleges koncentrációt fel kell tüntetni a vizsgálati jegyzőkönyvben, azonban a letális koncentráció értékének kiszámításához csak a tényleges koncentrációkat kell felhasználni.

22. Lehetőség szerint a vizsgált vegyi anyag egyetlen tételét kell használni, és a vizsgált mintát olyan körülmények között kell tárolni, hogy megőrződjön annak tisztasága, homogenitása és stabilitása. A vizsgálat megkezdését megelőzően el kell végezni a vizsgált vegyi anyag jellemzését, meghatározva többek között annak tisztaságát, valamint amennyiben technikailag lehetséges, az észlelt szennyező anyagok és szennyeződések azonosságát és mennyiségét. Ez többek között – de nem kizárólag – a következő adatokkal mutatható ki: retenciós idő és relatív csúcsterület, tömegspektroszkópiai vagy gázkromatográfiás elemzéssel meghatározott molekulatömeg, illetve más becslések. Bár a vizsgált minta azonosságának meghatározása nem tartozik a vizsgálati laboratórium feladatai közé, óvatosságból érdemes lehet a vizsgálati laboratóriumban legalábbis korlátozott módon (például szín, fizikai jelleg stb. alapján) meggyőződni a megbízó által adott jellemzés helytállóságáról.

23. Az expozíciós légkört amennyire csak lehet, állandó állapotban kell tartani, továbbá az analitikai módszertől függően folyamatosan és/vagy időszakosan ellenőrizni kell. Időszakos mintavétel esetén a kamrából a négyórás vizsgálat során legalább kétszer kell légköri mintát venni. Ha az alacsony légáramlási sebesség vagy koncentráció miatt ez nem megoldható, a teljes expozíciós időszak alatt egy mintavétel végezhető. Ha jelentős ingadozás figyelhető meg az egyes minták között, a következőnek vizsgált koncentrációkat expozíciónként négy minta alapján kell vizsgálni. Az egyes kamrakoncentrációminták gázok és gőzök esetében legfeljebb ± 10 %-kal, folyékony vagy szilárd

▼M4

aeroszolok esetében pedig legfeljebb ± 20 %-kal térhetnek el az átlagkoncentrációtól. A kamra egyensúlyi állapotának kialakulásához szükséges időt (t_{95}) ki kell számítani és fel kell jegyezni. Egy adott expozíció időtartama magában foglalja a vizsgált vegyi anyag előállításának idejét, utóbbihoz pedig figyelembe kell venni a t_{95} eléréséhez szükséges időt. A t_{95} becsléséhez a 39. iránymutatásban (2) található útmutatás.

24. A nagyon összetett, gázokból/gőzökből és aeroszolokból álló keverékek (például égésterekből származó, valamint meghatározott célra szolgáló végfelhasználói termékekből/készülékekből kibocsátott vizsgált vegyi anyagok) esetén az egyes fázisok eltérően viselkedhetnek az inhalációs kamrában, ezért mindegyik fázishoz (gáz/gőz és aeroszol) legalább egy indikátoranyagot (analitot) – általában a keverék elsődleges hatóanyagát – kell kiválasztani. Amennyiben a vizsgált vegyi anyag keverék, az analitikai koncentrációt a keverék, nem pedig csak a hatóanyag vagy összetevő (analit) vonatkozásában kell a jegyzőkönyvben feltüntetni. A tényleges koncentrációról további információ a 39. iránymutatásban található (2).

Vizsgált vegyi anyag: részecskeméret-eloszlás

25. Az aeroszolok részecskeméret-eloszlását mindegyik 4 órás expozíció során legalább kétszer meg kell határozni sorozatos ütközésmérő vagy alternatív műszer, például aerodinamikai részecskeméret-meghatározó segítségével. Ha bizonyítható, hogy a sorozatos ütközésmérővel és az alternatív műszerrel kapott eredmények egyeznek, az alternatív műszer a teljes vizsgálat folyamán használható. Az elsődleges műszerrel párhuzamosan egy második eszközt, például gravimetriai szűrőt vagy impingert/gázbuborékoltatót kell használni az elsődleges műszer mintavételi hatékonyságának ellenőrzésére. A részecskeméret-elemzés útján kapott tömegkoncentrációnak a szűrőelemzéssel kapott tömegkoncentrációt ésszerű mértékben meg kell közelítenie (lásd a 39. iránymutatást (2)). Ha a vizsgálat kezdeti szakaszában egyezés mutatható ki, a további ellenőrző mérések mellőzhetők. Az állatok jóléte érdekében intézkedéseket kell tenni az expozíció eseteges megismétlését szükségessé tevő kétes adatok előfordulásának minimalizálása érdekében. Gőzök esetében a részecsekeméret-eloszlást mesterségesen kell beállítani, ha fennáll annak a lehetősége, hogy a gőz lecsapódásával aeroszol keletkezhet, vagy ha vegyes fázisok alkotására képes részecskéket észlelünk a gőzatmoszférában (lásd a 15. bekezdést).

ELJÁRÁS

26. Az alábbiakban kétféle vizsgálatot ismertetünk: a hagyományos és a C × t protokollt. Mindkét protokoll magában foglalhat egy dózisbehatároló vizsgálatot, egy fő vizsgálatot és/vagy egy határérték-vizsgálatot (hagyományos protokoll) vagy egy határkoncentráció mellett végzett vizsgálatot (C × t). Ha ismert, hogy valamelyik nem érzékenyebb a vizsgált anyagra, a vizsgálatvezető dönthet úgy, hogy a vizsgálatokat csak az érzékenyebb nemen kell elvégezni. Patkányoktól eltérő rágcsálófajok csak orron át történő expozíciója esetén az expozíció maximális időtartama kiigazítható a fajspecifikus szorongás minimalizálása érdekében. A vizsgálat megkezdése előtt minden rendelkezésre álló adatot figyelembe kell venni az állatkísérletek számának minimalizálására. Az e melléklet B.52. fejezetét (4) alkalmazva előállított adatok például szükségtelenné tehetik a dózisbehatároló vizsgálat elvégzését, valamint azt is kimutathatják, hogy valamelyik nem érzékenyebb-e a vizsgált anyagra (lásd a 39. iránymutatást (2)).

▼M4

HAGYOMÁNYOS PROTOKOLL:

Általános megfontolások: hagyományos protokoll

27. A hagyományos vizsgálat keretében állatok csoportjait tesszük ki meghatározott (általában 4 órás) időtartamra a vizsgált vegyi anyagnak, vagy csak orron keresztüli, vagy az egész testfelületen át történő expozícióra szolgáló kamrában. Az állatokat vagy határkoncentrációnak (határérték-vizsgálat), vagy legalább három, fokozatosan növekvő koncentrációnak tesszük ki (fő vizsgálat). A fő vizsgálat előtt dózisbehatároló vizsgálat végezhető, hacsak nem állnak már rendelkezésre bizonyos információk a vizsgált vegyi anyagról, például egy korábbi, a B.52. fejezet szerint végzett vizsgálat alapján (lásd a 39. iránymutatást (2)).

Dózisbehatároló vizsgálat: hagyományos protokoll

28. A dózisbehatároló vizsgálat célja a vizsgált vegyi anyag hatóképességének becslése, a vegyi anyagra való érzékenység tekintetében a nemek között fennálló különbségek meghatározása, valamint a fő vizsgálat és a határérték-vizsgálat során alkalmazott koncentrációszintek kiválasztásának elősegítése. A dózisbehatároló vizsgálat során alkalmazandó koncentrációszintek kiválasztásakor fel kell használni minden rendelkezésre álló információt, beleértve a rendelkezésre álló (Q)SAR-adatokat és a hasonló vegyi anyagok adatait. Mindegyik koncentrációnak legfeljebb három hím és három nőstény tehető ki (a nemek közötti különbség megállapításához nemenként 3 állat vizsgálatára lehet szükség). A dózisbehatároló vizsgálat vonatkozhat egyetlen koncentrációra, de szükség esetén több koncentráció is vizsgálható. A dózisbehatároló vizsgálat során nem vizsgálható annyi állat és koncentráció, hogy az már egy fő vizsgálathoz legyen hasonló. Dózisbehatároló vizsgálat helyett alkalmazhatók egy, a B.52. módszer (4) szerint elvégzett korábbi vizsgálat adatai (lásd a 39. iránymutatást (2)).

Határérték-vizsgálat: hagyományos protokoll

29. Határérték-vizsgálatot akkor kell végezni, ha a vizsgált vegyi anyagról ismert vagy várható, hogy gyakorlatilag nem mérgező, azaz csak a hatóságilag előírt határkoncentráció felett idéz elő toxikus reakciót. A határérték-vizsgálat során egyetlen, három hímből és három nőstényből álló csoportot teszünk ki a vizsgált vegyi anyagnak határkoncentráció mellett. A vizsgált vegyi anyag toxicitásával kapcsolatban hasonló vizsgált vegyi anyagokra vonatkozó adatokból nyerhetők információk, figyelembe véve a toxikológiai szempontból fontos komponenseket, valamint azok százalékos arányát. Olyan esetekben, ha kevés az anyag toxicitásával kapcsolatos információ, vagy egyáltalán nem áll rendelkezésre, vagy ha a vizsgálandó vegyi anyag várhatóan toxikus, a fő vizsgálatot kell elvégezni.

30. A határkoncentrációk kiválasztását általában a szabályozási követelmények határozzák meg. Az 1272/2008/EK rendelet alkalmazása esetén a gázok, gőzök és aeroszolok határkoncentrációja rendre 20 000 ppm, 20 mg/l és 5 mg/l (vagy az elérhető legnagyobb koncentráció) (3). Bizonyos vizsgált vegyi anyagok, különösen a gőzök és az aeroszolok határkoncentrációjának előállítása technikai szempontból kihívást jelenthet. Aeroszolok vizsgálata esetén az elsődleges cél a belélegezhető részecskeméret (1–4 μm-es MMAD) elérése. Ez a legtöbb vizsgált vegyi anyag esetén 2 mg/l koncentrációnál érhető el. Aeroszolok 2 mg/l feletti koncentrációnál történő vizsgálatát csak akkor szabad megkísérelni, ha ezzel elérhető a belélegezhető részecskeméret (lásd a 39. iránymutatást (2)). Az 1272/2008/EK rendelet szerint az állatok jóléte érdekében a határkoncentráció felett végzett vizsgálatok ellenjavallottak (3). A határkoncentráció alkalmazását csak abban az esetben szabad kilátásba helyezni, ha egy ilyen vizsgálat eredménye nagy valószínűséggel közvetlen jelentőséggel bírna az emberi egészség védelme szempontjából (3), továbbá ha mindezt a vizsgálati jegyzőkönyvben indokoljuk. Robbanásveszélyes vizsgált vegyi anyagok esetén ügyelni kell a robbanást elősegítő körülmények elkerülésére. A szükségtelen állatkísérletek elkerülése végett a határérték-vizsgálatot megelőzően állatok nélküli próbavizsgálatot kell végezni annak érdekében, hogy a kamrában elérhetők legyenek a határérték-vizsgálathoz szükséges körülmények.

▼M4

31. Ha a határkoncentrációnál állatok elhullását vagy elhullásközeli állapotát figyeljük meg, a határérték-vizsgálat eredményei dózisbehatároló vizsgálatként használhatók más koncentrációknál végzett további vizsgálatokhoz (lásd a fő vizsgálatról szóló részt). Ha a vizsgált vegyi anyag fizikai vagy kémiai tulajdonságaiból adódóan a határkoncentráció nem érhető el, a legmagasabb elérhető koncentrációt kell vizsgálni. Ha az elhullási arány az elérhető legnagyobb koncentráció mellett 50 %-nál alacsonyabb, nincs szükség további vizsgálatok elvégzésére. Ha a határkoncentrációt nem sikerült elérni, a vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell ennek magyarázatát, valamint az alátámasztó adatokat. Ha egy gőz legnagyobb elérhető koncentrációja nem vált ki toxikus reakciót, a vizsgált vegyi anyag folyékony aeroszoljának előállítására lehet szükség.

Fő vizsgálat: hagyományos protokoll

32. A fő vizsgálatot általában koncentrációszintenként öt hímen és öt nőstényen végezzük el (vagy a vizsgált anyagra érzékenyebb nem 5 egyedén, amennyiben az ismert) legalább három koncentrációszinten. A megalapozott statisztikai elemzés érdekében elegendő számú koncentrációszintet kell alkalmazni. Az egyes expozíciós csoportok vizsgálata közötti időtartamot a mérgezési tünetek megjelenésének időpontja, időtartama és súlyossága határozza meg. Az állatok következő koncentrációszintnek való expozícióját addig kell halasztani, amíg ésszerű biztonsággal nem várható az előzőleg vizsgált állatok túlélése. Ez lehetővé teszi a vizsgálatvezető számára a következő expozíciós csoport célkoncentrációjának kiigazítását. Mivel mindez összetett technológiát igényel, inhalációs vizsgálatok esetén nem feltétlenül praktikus, ezért az állatok következő koncentrációszintnek való expozícióját korábbi tapasztalatokra és tudományos mérlegelésre kell alapozni. Keverékek vizsgálata esetén a 39. iránymutatás (2) alkalmazandó.

KONCENTRÁCIÓ × IDŐ (C × T) PROTOKOLL

Általános megfontolások: C × t protokoll

33. Az inhalációs toxicitás értékeléséhez a hagyományos protokoll helyett megfontolható egy fokozatos C x t vizsgálat elvégzése (12) (13) (14). Ez a módszer lehetővé teszi az állatok vizsgált vegyi anyagnak több koncentrációszinten és több időtartamon keresztül történő expozícióját. Minden vizsgálatot csak orron át történő expozícióra szolgáló kamrában végzünk el (az egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamrák alkalmazása ennél a protokollnál nem praktikus). A protokollt az 1. függelékben található folyamatábra szemlélteti. Szimulációs elemzéssel megállapították, hogy mind a hagyományos, mind a C × t protokoll alkalmas megalapozott LC_{50} értékek meghatározására, azonban a megalapozott LC_{01} és LC_{10} értékek meghatározására általában alkalmasabb a C × t protokoll (15).

34. Szimulációs elemzéssel igazolták, hogy C × t-intervallumonként két állat (mindkét nem vizsgálata estén nemenként egy, vagy a vizsgált anyagra érzékenyebb nemből két példány) általában elegendő, ha a fő vizsgálat során 4 koncentrációt és 5 expozíciós időtartamot vizsgálunk. Bizonyos körülmények között a vizsgálatvezető döntése alapján minden C × t-intervallumhoz nemenként két patkány alkalmazható (15). Ha minden koncentrációhoz és időponthoz nemenként 2 állatot alkalmazunk, csökkenhet a becslések torzítása és variabilitása, nőhet a sikeres becslések aránya, és javulhat a konfidenciaintervallum lefedettsége. A becsléshez használt adatokhoz való nem kellően szoros illeszkedés esetén azonban (amennyiben nemenként egy állatot vagy az adott anyagra érzékenyebb nemből két példányt vizsgálunk) egy 5. expozíciós koncentráció használata is elég lehet. A C × t vizsgálat során használandó állatok és koncentrációk számával kapcsolatban a 39. iránymutatás tartalmaz további útmutatást (2).

▼M4

Dózisbehatároló vizsgálat: C × t protokoll

35. A dózisbehatároló vizsgálat célja a vizsgált vegyi anyag hatóképességének becslése és a fő vizsgálat során alkalmazott koncentrációszintek kiválasztásának elősegítése. A fő vizsgálat során alkalmazandó megfelelő kiindulási koncentráció kiválasztása, valamint a vizsgált állatok számának minimalizálása érdekében nemenként és koncentrációnként legfeljebb három állatot alkalmazó dózisbehatároló vizsgálatra lehet szükség (részleteket lásd a 39. iránymutatás III. függelékében (2)). A nemek közötti eltérés megállapításához nemenként három állat vizsgálata lehet szükséges. Ezeket az állatokat egyetlen, általában 240 perces időtartamra kell kitenni a vizsgált anyagnak. A megfelelő vizsgálati légkörök előállításának megvalósíthatóságát az állatok nélkül végzett előzetes műszaki vizsgálatok során kell felmérni. Általában nem szükséges dózisbehatároló vizsgálatot végezni, ha elhullási adatok állnak rendelkezésre egy, a B.52. módszer szerint végzett vizsgálat alapján (4). A kiindulási célkoncentráció B.2. módszer szerinti vizsgálat során való kiválasztásakor a vizsgálatvezetőnek figyelembe kell vennie az esetlegesen rendelkezésre álló, B.52. módszer szerinti vizsgálatok (4) során mindkét nem és minden vizsgált koncentráció tekintetében megfigyelt elhullási mintákat (lásd a 39. iránymutatást (2)).

Kiindulási koncentráció: C × t protokoll

36. Kiindulási koncentrációként (I. expozíciós szakasz) (1. függelék) vagy határkoncentrációt, vagy egy, a vizsgálatvezető által a dózisbehatároló vizsgálat alapján kiválasztott koncentrációt alkalmazunk. Ennek a koncentrációnak nemenként 1 állatot teszünk ki több időtartamra (például 15, 30, 60, 120 vagy 240 percre), így az állatok teljes száma 10 (ezt nevezik az I. expozíciós szakasznak) (1. függelék).

37. A határkoncentrációk kiválasztását általában a szabályozási követelmények határozzák meg. Az 1272/2008/EK rendelet alkalmazása esetén a gázok, gőzök és aeroszolok határkoncentrációja rendre 20 000 ppm, 20 mg/l és 5 mg/l (vagy az elérhető legnagyobb koncentráció) (3). Bizonyos vizsgált vegyi anyagok, különösen a gőzök és az aeroszolok határkoncentrációjának előállítása technikai szempontból kihívást jelenthet. Aeroszolok vizsgálata esetén a cél a belélegezhető részecskeméret (azaz 1–4 μm-es MMAD) elérése 2 mg/l határkoncentráció mellett. Ez a legtöbb vizsgált vegyi anyag esetén elérhető. Aeroszolok 2 mg/l feletti koncentrációnál történő vizsgálatát csak akkor szabad megkísérelni, ha ezzel elérhető a belélegezhető részecskeméret (lásd a 39. iránymutatást (2)). Az 1272/2008/EK rendelet szerint az állatok jóléte érdekében a határkoncentráció felett végzett vizsgálatok ellenjavallottak (3). A határkoncentráció feletti vizsgálatot csak abban az esetben szabad kilátásba helyezni, ha egy ilyen vizsgálat eredménye nagy valószínűséggel közvetlen jelentőséggel bírna az emberi egészség védelme szempontjából (3); a vizsgálati jegyzőkönyvben mindezt indokolni kell. Robbanásveszélyes vizsgált vegyi anyagok esetén ügyelni kell a robbanást elősegítő körülmények elkerülésére. A szükségtelen állatkísérletek elkerülése végett a kiindulási koncentráció melletti vizsgálatot megelőzően állatok nélküli próbavizsgálatot kell végezni annak érdekében, hogy a kamrában elérhetők legyenek az e koncentrációhoz szükséges körülmények.

38. Ha a kiindulási koncentrációnál állatok elhullását vagy elhullásközeli állapotát figyeljük meg, az e koncentráció mellett kapott eredmények felhasználhatók más koncentrációk mellett végzett további vizsgálatok kiindulópontjaként (lásd a fő vizsgálatról szóló részt). Ha a vizsgált vegyi anyag fizikai vagy kémiai tulajdonságaiból adódóan a határkoncentráció nem érhető el, a legmagasabb elérhető koncentrációt kell vizsgálni. Ha az elhullási arány az elérhető legnagyobb koncentráció mellett 50 %-nál alacsonyabb, nincs szükség további vizsgálatok elvégzésére. Ha a határkoncentrációt nem sikerült elérni, a vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell ennek magyarázatát, valamint az alátámasztó adatokat. Ha egy gőz legnagyobb elérhető koncentrációja nem vált ki toxikus reakciót, a vizsgált vegyi anyag folyékony aeroszoljának előállítására lehet szükség.

▼M4

Fő vizsgálat: C x t protokoll

39. A fő vizsgálat során vizsgált kiindulási koncentrációként (I. expozíciós szakasz) (1. függelék) vagy határkoncentrációt, vagy egy, a vizsgálatvezető által a dózisbehatároló vizsgálat alapján kiválasztott koncentrációt alkalmazunk. Ha az I. expozíciós szakasz során vagy azt követően állatok elhullását figyeljük meg, az elhullást okozó minimális koncentrációt (C x t) kell alapul venni a II. expozíciós szakasz során alkalmazandó koncentrációk és expozíciós időtartamok meghatározásához. Minden soron következő expozíciós szakaszt az azt megelőző szakasz határoz meg (lásd az 1. függeléket).

40. Számos vizsgált vegyi anyag esetében a kiindulási koncentráció mellett kapott eredmények, valamint három további, kisebb időbeli távolságú (azaz az expozíciós időtartamok közötti, két egymást követő időtartam – általában √2 értékű – tényezője által kifejezett geometriai távolságú) expozíciós szakasz eredményei elegendők a C x t és az elhullás közötti összefüggés meghatározására (15), azonban egy 5. expozíciós koncentráció alkalmazása előnyökkel járhat (lásd az 1. függeléket és a 39. iránymutatást (2)). A C x t protokoll eredményeinek matematikai feldolgozását az 1. függelék ismerteti.

MEGFIGYELÉSEK

41. Az expozíció időtartama alatt az állatokat gyakori klinikai megfigyeléseknek kell alávetni. Az expozíciót követően az expozíció napján legalább kétszer, vagy – amennyiben az állatok kezelésre adott reakciója ezt indokolja – annál gyakrabban, az azt követő 14 nap során pedig naponta legalább egyszer klinikai megfigyeléseket kell végezni. A megfigyelés időtartama nem rögzített, hanem a klinikai tünetek jellege és jelentkezésének ideje, valamint a felépülés időtartama alapján határozandó meg. Fontos a toxicitási tünetek megjelenésének és megszűnésének időpontja, különösen, ha fennáll a toxicitási tünetek késleltetett megjelenésének tendenciája. Minden megfigyelést szisztematikusan rögzíteni kell olyan módon, hogy minden állat esetében önálló adatsort veszünk fel. Állatjóléti okokból humánus módon el kell pusztítani az elhullásközeli állapotban lévő, valamint súlyos fájdalom és/vagy tartós és súlyos szorongás jeleit mutató állatokat. A toxicitás klinikai tünetei előfordulásának vizsgálata során ügyelni kell arra, hogy az expozíciós eljárás okozta kezdeti beteges megjelenést és átmeneti légúti változásokat ne azonosítsuk tévesen a vizsgált vegyi anyaggal összefüggő, az állatok idő előtti elpusztítását szükségessé tevő toxicitásként. A humánus végpontokról szóló (19. számú) iránymutatásban összegzett elveket és követelményeket is figyelembe kell venni (7). Ha az állatokat humánus okok miatt el kell pusztítani, vagy ha azok elhullnak, a lehető legpontosabban fel kell jegyezni az elhullás időpontját.

42. A ketrecben tartott állatok megfigyelésének ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártya, valamint a légzőrendszer, a keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszer, továbbá a szomatomotoros aktivitás és a viselkedési minták változásaira. Lehetőség szerint fel kell jegyezni, ha különbséget lehet tenni a helyi és szisztémás hatások között. Figyelmet kell szentelni a remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma megfigyelésére. A végbélben mért hőmérséklet bizonyítékot szolgáltathat a kezelés vagy a fogság okozta bradipnoés reflexre vagy hipo-/hipertermiára.

Testsúly

43. Az egyes állatok súlyát a szoktatási időszak során egy alkalommal, az expozíció napján (0. nap) az expozíció előtt, valamint legalább az 1., 3. és 7. napon (azt követően pedig hetente) egy-egy alkalommal, továbbá az 1. napon túli elhullás vagy elpusztítás időpontjában fel kell jegyezni. A testsúly a toxicitás kulcsfontosságú indikátorának számít, ezért a vizsgálat előtti értékekhez képest legalább 20 %-os tartós súlycsökkenést mutató állatokat szorosan figyelemmel kell kísérni. Az expozíciót követő időszak végén az életben maradt állatokat újra megmérjük, majd humánus módon elpusztítjuk.

▼M4

Patológia

44. Minden kísérleti állatot makroszkópos boncolásnak kell alávetni, azokat is, amelyek a vizsgálat során elpusztultak, vagy amelyeket állatjóléti okok miatt el kellett pusztítani és ki kellett vonni a vizsgálatból. Ha a boncolás nem végezhető el rögtön azután, hogy az elpusztult állatot észrevettük, az állatot hűtve (nem fagyasztva) kell tárolni az autolízis minimalizálásához kellően alacsony hőmérsékleten. A boncolást a lehető leghamarabb, általában egy vagy két napon belül el kell végezni. Minden állat esetén fel kell jegyezni minden makroszkopikus patológiai elváltozást, különös tekintettel a légzőrendszert érintő változásokra.

45. A vizsgálat értelmező értékének fokozása érdekében előzetesen, terv szerint kilátásba helyezhetők olyan további vizsgálatok, mint az életben maradt patkányok tüdeje súlyának megmérése és/vagy az irritációnak a légzőrendszer mikroszkópos vizsgálatával való igazolása. Megvizsgálhatók azok a szervek is, amelyek makroszkopikus patológia jeleit mutatják 24 óráig vagy annál tovább életben maradt állatoknál, valamint olyan szervek, amelyekről ismert vagy várható, hogy a vizsgált anyag hatást gyakorolt azokra. A teljes légzőrendszer mikroszkópos vizsgálata hasznos információkkal szolgálhat a vízzel könnyen reagáló vizsgált vegyi anyagokról, például a savakról és higroszkópos vegyi anyagokról.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

46. Meg kell adni az egyes állatok testsúlyával és boncolási eredményeivel kapcsolatos adatokat. A klinikai megfigyelések adatait táblázatos formában össze kell foglalni, minden egyes vizsgált csoporthoz megadva a csoportban lévő állatok számát, a specifikus mérgezési tüneteket mutató, valamint a vizsgálat során elhullott vagy humánus okokból elpusztított állatok számát, az egyes állatok elhullásának időpontját, a toxikus hatások leírását, időbeli lefolyását és visszafordíthatóságát, valamint a boncolások eredményeit.

Vizsgálati jegyzőkönyv

47. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell értelemszerűen tartalmaznia:

Kísérleti állatok és azok tartása

— a ketrecben való tartás körülményei, beleértve a következőket: az állatok ketrecenkénti száma (vagy számának változása), az alom anyaga, környezeti hőmérséklet és relatív páratartalom, a megvilágítás időtartama, valamint a takarmány meghatározása,

— a vizsgált faj/törzs, valamint a patkánytól eltérő faj alkalmazásának indokolása,

— az állatok száma, kora és neme,

— a véletlen kiválasztás módszere,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány típusa/eredete, a víz eredete),

— a vizsgálat előtti esetleges kondicionálás leírása, beleértve a takarmányt, a karantént és a betegség kezelését,

▼M4

Vizsgált vegyi anyag

— fizikai jelleg, tisztaság, valamint – ha lényeges – fizikai és kémiai tulajdonságok (beleértve az izomerizációt),

— azonosító adatok és – amennyiben ismert – a Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám),

Vivőanyag

— a vivőanyag használatának, valamint kiválasztásának indokolása (ha a vivőanyag nem víz),

— múltbeli vagy párhuzamosan kapott adatok, amelyek igazolják, hogy a vivőanyag nem befolyásolja a vizsgálat eredményét,

Inhalációs kamra

— az inhalációs kamra leírása, beleértve annak méreteit és térfogatát,

— az állatok expozíciójához és a légkör előállításához használt berendezések eredete és leírása,

— a hőmérséklet, páratartalom, részecskeméret és tényleges koncentráció mérésére szolgáló berendezések,

— a levegő forrása és a bevitt/elszívott levegő kezelése, valamint a kondicionáló rendszer,

— az eszközök homogén vizsgálati légkör biztosítása érdekében történő kalibrálására alkalmazott módszerek,

— nyomáskülönbség (pozitív vagy negatív),

— expozíciós nyílások száma kamránként (csak orron keresztüli expozíció), az állatok helye a rendszerben (egész testfelületen keresztüli expozíció),

— a vizsgálati légkör időbeli homogenitása/stabilitása,

— a hőmérséklet- és páratartalom-érzékelők, valamint a vizsgálati légkör mintavételének helye a kamrában,

— légáramlási sebességek, légáramlási sebesség expozíciós nyílásonként (csak orron keresztüli expozíció), vagy az állatok terhelése kamránként (egész testfelületen keresztüli expozíció),

— adott esetben az oxigén és a szén-dioxid mérésére használt eszközökre vonatkozó információk,

— az inhalációs kamra egyensúlyi állapotának eléréséhez szükséges idő (t_{95}),

— a térfogatváltozások óránkénti száma,

— mérőberendezések (ha vannak),

Expozíciós adatok

— a fő vizsgálathoz kiválasztott célkoncentráció indokolása,

— névleges koncentrációk (az inhalációs kamrába való bejuttatásra előállított vizsgált vegyi anyag össztömege osztva a kamrán áthaladt levegő térfogatával),

— a vizsgált vegyi anyagnak az állatok belégzési zónájából gyűjtött tényleges koncentrációi; a heterogén halmazállapotokat (gáz, gőz, aeroszol) felvevő keverékek esetén mindegyik külön elemezhető,

▼M4

— minden levegőbeli koncentrációt tömegegységekben (például mg/l, mg/m^3 stb.) kell megadni; zárójelben a térfogategységekben (például ppm, ppb stb.) kifejezett értékek is feltüntethetők;

— részecskeméret-eloszlás, tömegfelező aerodinamikai átmérő (MMAD), valamint geometriai szórás (σg), beleértve azok kiszámításának módját. Jegyzőkönyvezni kell az egyes részecskeméret-elemzéseket,

Vizsgálati körülmények

— a vizsgált vegyi anyag előkészítésének részletei, beleértve a szilárd anyagok részecskeméretének csökkentésére vagy a vizsgált vegyi anyag oldatainak készítésére esetlegesen alkalmazott eljárások részleteit. Amennyiben a mechanikai folyamatok megváltoztatták a vizsgált vegyi anyag összetételét, a vizsgált vegyi anyag összetételének ellenőrzése érdekében végzett elemzések eredményeit is fel kell tüntetni,

— a vizsgálati légkör előállítására és az állatok vizsgálati légkörnek való kitételére alkalmazott berendezések leírása (lehetőség szerint vázlatrajzzal),

— az alkalmazott kémiai analitikai módszer és a módszer validációjának részletei (beleértve a vizsgált vegyi anyag mintavételi közegből való visszanyerésének hatásfokát),

— a vizsgált koncentrációk kiválasztásának indokolása,

Eredmények

— a kamrabeli hőmérséklet, páratartalom és légáramlás táblázatos összefoglalása,

— a kamra névleges és tényleges koncentrációs adatainak táblázatos összefoglalása,

— részecskeméret-adatok táblázatos összefoglalása, beleértve az analitikai mintavételi adatokat, a részecskeméret-eloszlást, valamint az MMAD és a σ_g számításait,

— a válaszadatok és a koncentrációszintek táblázatos összefoglalása minden egyes állatra vonatkozóan (azaz a mérgezési tüneteket mutató és köztük az elhullt állatok, a hatások jellege, súlyossága, megjelenésének időpontja és időtartama),

— az egyes állatok vizsgálat során mért testsúlya, az elhullás dátuma és időpontja, amennyiben az a tervszerű elpusztítást megelőzően történt, a toxicitási tünetek megjelenésének időbeli alakulása, valamint annak megjelölése, hogy azok visszafordíthatók voltak-e az egyes állatoknál,

— a boncolások és adott esetben a kórszövettani vizsgálatok eredményei minden egyes állatra vonatkozóan,

— letalitási becslések (például LC_{50}, LD_{01}), beleértve a 95 %-os konfidenciahatárokat és a meredekséget (amennyiben az értékelési módszerrel meghatározható),

— statisztikai reláció, beleértve az n exponens becslését (C × t protokoll). Fel kell tüntetni az alkalmazott statisztikai szoftver nevét,

▼M4

Az eredmények szöveges értékelése és értelmezése

— különös hangsúlyt kell fektetni az e vizsgálati módszer feltételeinek – például a határkoncentrációnak vagy a részecskeméretnek – való megfelelés érdekében alkalmazott módszerek leírására,

— ki kell térni a részecskék belélegezhetőségére az általános megállapítások tükrében, különösen ha a részecskeméretre vonatkozó feltétel nem teljesült,

— magyarázatot kell szolgáltatni, amennyiben a humánus végpontokról szóló OECD-iránymutatás (8) szerinti kritériumok alapján humánus módon el kellett pusztítani a fájdalommal küszködő vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutató állatokat,

— amennyiben az e melléklet B.52. fejezete (4) szerinti vizsgálatot felfüggesztettük, hogy helyette a jelen B.2. vizsgálati módszert alkalmazzuk, a döntést indokolni kell,

— a vizsgálat általános értékelésének ismertetnie kell a névleges és a tényleges koncentrációk meghatározására használt módszerek konzisztenciáját, valamint a tényleges és a névleges koncentráció közötti összefüggést,

— ki kell térni az elhullás valószínű okára, valamint az elsődleges hatásmechanizmusra (szisztémás vagy helyi).

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(3) Az Európai Parlament és a Tanács 2008. december 16-i 1272/2008/EK rendelete az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról, HL L 353., 2008.12.31., 1. o.

(4) E melléklet B.52., Akut inhalációs toxicitás – Akut toxikus osztály (ATC) módszer című fejezete.

(5) E melléklet B.40., In vitro bőrkorrózió: transzkután elektromos rezisztencia vizsgálat (TER) című fejezete.

(6) E melléklet B.40A., In vitro bőrkorrózió: emberi bőrmodellen végzett vizsgálat című fejezete.

(7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Available at: [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. AppéldáulToxicol. 18: 321-327.

(10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

(11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. AppéldáulToxicol. 27: 160-167.

(12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278-290.

(13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105-117.

(14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65-71.

(15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C x t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

FOGALOMMEGHATÁROZÁS

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼M4

1. függelék

C × t PROTOKOLL

1. Az inhalációs toxicitás értékeléséhez a hagyományos protokoll helyett megfontolható egy fokozatos koncentráció × idő (C × t) vizsgálat elvégzése (12) (13) (14). Ez a vizsgálat lehetőség szerint abban az esetben végzendő el, ha meghatározott szabályozási vagy tudományos igény miatt, például veszélyhelyzeti intézkedések tervezéséhez vagy területrendezéshez több időtartamon át végzett állatkísérletekre van szükség. A módszer általában egy határkoncentráción végzett vizsgálattal kezdődik (I. expozíciós szakasz), amelynek során az állatokat a vizsgált anyagnak öt időtartamra (például 15, 30, 60, 120 és 240 percre) tesszük ki úgy, hogy egyetlen expozíciós szakasz során több időtartamot vizsgálunk (lásd az 1. ábrát). Az 1272/2008/EK rendelet alkalmazása esetén a gázok, gőzök és aeroszolok határkoncentrációja rendre 20 000 ppm, 20 mg/l és 5 mg/l. Ezek a szintek kizárólag akkor léphetők túl, ha az adott szinteken történő vizsgálatot szabályozási vagy tudományos igény indokolja (lásd a B.2. fejezet fő szövegének 37. bekezdését).

2. Amennyiben kevés a vizsgált vegyi anyag toxicitásával kapcsolatos információ, vagy egyáltalán nem áll rendelkezésre, dózisbehatároló vizsgálatot kell végezni, amelynek során nemenként legfeljebb 3 állatból álló csoportokat teszünk ki a vizsgálatvezető által kiválasztott célkoncentrációknak, általában 240 percre.

3. Ha az I. expozíciós szakasz során határkoncentrációt vizsgálunk, és az elhullási arány 50 % alatti, nincs szükség további vizsgálatokra. Amennyiben szabályozási vagy tudományos igény mutatkozik a koncentráció, az idő és a válasz közötti összefüggésnek a megjelölt határkoncentrációt meghaladó szinten történő meghatározására, a következő expozíciót magasabb szinten, például határkoncentráció kétszeresénél kell végrehajtani (lásd az 1. ábrán a 2L szintet).

4. Ha a határkoncentrációnál toxicitást figyelünk meg, további vizsgálat (fő vizsgálat) elvégzése szükséges. Ezeket a további expozíciókat vagy alacsonyabb koncentrációk mellett (az 1. ábrán a II., III. vagy IV'. expozíciós szakasz), vagy magasabb koncentrációk mellett, rövidebb időtartamon át (az 1. ábrán a IV. expozíciós szakasz) kell elvégezni, kiigazított és egymástól kevésbé távoli időtartamok alkalmazásával.

5. A vizsgálatot (kiindulási koncentráció és további koncentrációk mellett) nemenként, koncentrációnként és időpontonként 1 állaton, vagy koncentrációnként és időpontonként a vizsgált anyagra érzékenyebb nem 2 példányán végezzük el. Bizonyos körülmények között a vizsgálatvezető nemenként, koncentrációnként és időpontonként 2 patkány (vagy koncentrációnként és időpontonként a vizsgált anyagra érzékenyebb nem 4 példányának) vizsgálata mellett is dönthet (15). Ha minden koncentrációhoz és időponthoz nemenként 2 állatot alkalmazunk, általában csökkenthető a becslések torzítása és variabilitása, növelhető a sikeres becslések aránya, és javítható a konfidenciaintervallum lefedettsége az itt ismertetett protokollhoz viszonyítva. További részletek a 39. iránymutatásban (2) olvashatók.

6. Ideális esetben mindegyik expozíciós szakaszt ugyanazon a napon hajtjuk végre. Ez lehetővé teszi, hogy a következő expozíciót addig halasszuk, amíg ésszerű biztonsággal nem várható az állatok túlélése, valamint a vizsgálatvezető számára lehetőséget biztosít a következő expozíciós szakasz célkoncentrációjának kiigazítására. Javasolt mindegyik expozíciós szakaszt azzal a csoporttal kezdeni, amelynek expozíciója a leghosszabb ideig fog tartani, például a 240 perces expozíciós csoporttal, folytatva a 120 perces expozíciós csoporttal stb. Ha például a 240 perces csoportban vizsgált állatok 90 perc elteltével elpusztulnak vagy a toxicitás súlyos tüneteit mutatják (például a légzésritmus szélsőséges változásait, beleértve a nehéz légzést), a következő csoportot nem volna célszerű 120 perces expozíciónak kitenni, mivel az elhullási arány feltehetően 100 %-os lenne. A vizsgálatvezetőnek javasolt tehát rövidebb (például 90, 65, 45, 33 és 25 perces) expozíciós időtartamokat választania az adott koncentrációhoz.

▼M4

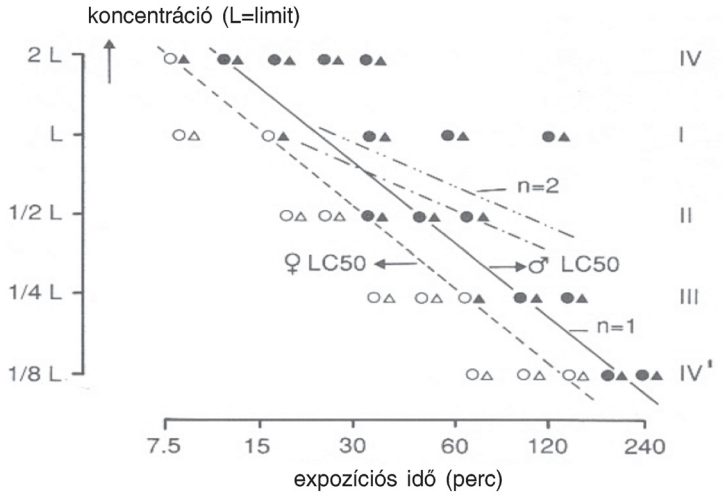
7. A kamrabeli koncentrációt gyakran kell mérni az egyes expozíciós időtartamok időarányosan súlyozott átlagkoncentrációjának meghatározása érdekében. Lehetőség szerint minden egyes állat elhullásának időpontját (nem pedig az expozíciós időtartamot) kell a statisztikai elemzés során felhasználni.

8. Az első négy expozíciós szakasz eredményeit megvizsgálva meg kell határozni a koncentráció-idő görbe azon részét, amelyen az adatok hiányosak (lásd az 1. ábrát). Nem megfelelő illeszkedés esetén egy további (5. koncentráció melletti) expozíció végezhető. Az 5. expozícióhoz használt koncentrációt és időtartamokat úgy kell megválasztani, hogy lefedjék e hiányzó adatokat.

9. Mindegyik expozíciós szakaszt (beleértve az elsőt is) felhasználjuk a koncentráció-idő-válasz összefüggés statisztikai elemzés útján történő meghatározására (16). Lehetőség szerint minden egyes C × t-intervallumhoz az időarányosan súlyozott átlagkoncentrációt és (amennyiben az elhullás az expozíció során következik be) az elhullásig eltelt expozíciós időt kell felhasználni.

1. ábra

Patkányoknál megfigyelt koncentráció-idő-elhullás összefüggés hipotetikus ábrája



Üres szimbólumok = életben maradt állatok; teli szimbólumok = elhullott állatok

Háromszög = nőstény; kör = hím

Összefüggő vonal = LC_{50} értékek (tartomány: 7,5–240 perc) n = 1 értékű hímeknél

Szaggatott vonal = LC_{50} értékek (tartomány: 7,5–240 perc) n = 1 értékű nőstényeknél

Pontozott vonal = hipotetikus LC_{50} értékek vonala hímek és nőstények vonatkozásában, ha az n értéke 2 lett volna (12).

Glosszárium

koncentráció:

expozíciós idő:

▼M4

10. Az alábbi példa egy lépésenkénti folyamatot szemléltet:

I. expozíciós szakasz – határkoncentrációnál végzett vizsgálat (lásd az 1. ábrát)

— Nemenként, koncentrációnként és időpontonként 1, összesen 10 állat ([a])

— Célkoncentráció ([b]) = határkoncentráció.

— Állatok öt csoportját tesszük ki a célkoncentrációnak 15, 30, 60, 120, illetve 240 percre.

↓

II. expozíciós szakasz ([c]) – fő vizsgálat

— Nemenként, koncentrációnként és időpontonként 1, összesen 10 állat.

— Állatok öt csoportját tesszük ki alacsonyabb koncentrációnak ([d]) (1/2L), némileg hosszabb (√2 tényezővel elválasztott) expozíciós időtartamokra (lásd az 1. ábrát).

↓

III. expozíciós szakasz – fő vizsgálat

— Nemenként, koncentrációnként és időpontonként 1, összesen 10 állat.

— Állatok öt csoportját tesszük ki alacsonyabb koncentrációnak ([d]) (1/4L), némileg hosszabb (√2 tényezővel elválasztott) expozíciós időtartamokra (lásd az 1. ábrát).

↓

IV'. expozíciós szakasz – fő vizsgálat

— Nemenként, koncentrációnként és időpontonként 1, összesen 10 állat.

— Állatok öt csoportját tesszük ki alacsonyabb koncentrációnak ([d]) (1/8L), némileg hosszabb (√2 tényezővel elválasztott) expozíciós időtartamokra (lásd az 1. ábrát).

↓ vagy

([a]) Amennyiben nem áll rendelkezésre információ az anyagra való érzékenység tekintetében a nemek között fennálló különbségről, mindkét nemhez tartozó patkányokat, azaz nemenként és koncentrációnként 1 állatot vizsgálunk. Meglévő információk alapján, vagy ha ezen expozíciós szakasz során nyilvánvalóvá válik, hogy az egyik nem érzékenyebb a vizsgált anyagra, a további vizsgálatok során mindegyik koncentrációszintnél az érzékenyebb nem 10 egyedét vizsgáljuk (koncentrációnként és időpontonként 2 állatot).

([b]) Az 1272/2008/EK rendelet alkalmazása esetén a gázok, gőzök és aeroszolok határkoncentrációja rendre 20 000 ppm, 20 mg/l és 5 mg/l. Várható toxicitás esetén vagy a dózisbehatároló vizsgálat eredményei alapján alacsonyabb kiindulási koncentrációkat kell választani. Szabályozási vagy tudományos igény esetén magasabb koncentráció is alkalmazható.

([c]) Az állatok következő koncentrációszintnek való expozícióját ideális esetben addig kell halasztani, amíg ésszerű biztonsággal nem várható az előzőleg kezelt állatok túlélése. Ez lehetővé teszi a vizsgálatvezető számára a következő expozíciós szakasz célkoncentrációjának és időtartamainak kiigazítását.

([d]) A kiindulási koncentráció mellett (az I. expozíciós szakaszban) elhullást okozó legalacsonyabb dózist (koncentráció × idő) vesszük alapul a koncentráció és az expozíciós időtartamok következő kombinációjának meghatározásakor. A koncentrációt általában felezzük (1/2L), és az állatokat új, az első expozíció során megfigyelt minimális halálos dózisszint (idő × koncentráció) ideje körül 1,4-es tényező (√2, lásd a 11. hivatkozást) alapján geometriailag elosztott expozíciós időtartamokból álló, sűrűbb felosztású időtartomány folyamán tesszük ki a vizsgált anyagnak. Ezen az ábrán (1. ábra) az I. expozíciós szakaszban először 15 percnél figyeltek meg elhullást; a II. szakasz időtartamait ezért a 30 perces időtartam körül határozzák meg 15, 21, 30, 42 és 60 percben. Az első két expozíciót követően határozottan javasolt az adatokat egy, a fentihez hasonló grafikonon ábrázolni, és ellenőrizni, hogy a koncentráció és az idő közötti összefüggés 45 fokos szöget zár be (n = 1), vagy a koncentráció-idő-válasz összefüggés meredeksége kisebb (például n = 2), illetve nagyobb (például n = 0,8). Az utóbbi esetekben erősen javasolt a következő koncentrációkat és időtartamokat ennek megfelelően kiigazítani.

▼M4

IV. expozíciós szakasz – fő vizsgálat

— Nemenként, koncentrációnként és időpontonként 1, összesen 10 állat.

— Állatok öt csoportját tesszük ki magasabb koncentrációnak ([e]) (2L), némileg rövidebb (√2 tényezővel elválasztott) expozíciós időtartamokra (lásd az 1. ábrát).

A C × t protokoll eredményeinek matematikai feldolgozása

11. Egy 4 vagy 5 expozíciós koncentrációra és 5 időtartamra kiterjedő C × t eljárással 20 vagy 25 adatpont kapható. Ezen adatpontok alapján statisztikai elemzéssel (16) kiszámítható a C × t összefüggés:

1. egyenlet:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

ahol C = koncentráció; t = az expozíció időtartama, vagy

2. egyenlet:

$$Response = f(C^n t)$$

ahol $n = b_1/b_2$.

Az 1. egyenlettel kiszámítható az LC_{50} értéke egy adott időtartamra (például 4 órára, 1 órára, 30 percre vagy a vizsgált időtartamok tartományán belüli bármely időtartamra) a P = 5 (50 %-os válasz) értéket alkalmazva. Megjegyzendő, hogy a Haber-szabály csak akkor alkalmazható, ha n = 1. Az LC_{01} a P = 2,67 érték segítségével számítható ki.

([e]) Bizonyos esetekben a koncentráció növelésére (2L) lehet szükség új, az első expozíció során megfigyelt minimális halálos koncentrációszint ideje körül 1,4-es tényező (√2) alapján geometriailag elosztott expozíciós időtartamokból álló, még sűrűbb felosztású időtartományt alkalmazva. Az expozíció minimális időtartamának lehetőség szerint meg kell haladnia az 5 percet, az expozíció maximális időtartama nem lehet több 8 óránál.

▼B

B.3. AKUT TOXICITÁS (DERMÁLIS)

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (B).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot naponta, a bőrre kell adagolni fokozatos adagokban több kísérleti állatcsoportnak, csoportonként egy adagot használva. Ezt követően megfigyelik a hatásokat és a halálesetek előfordulását. A vizsgálat során elpusztult állatokat és a vizsgálat végéig életben maradó állatokat is fel kell boncolni.

A súlyos és tartós betegség, illetve fájdalom jeleit mutató állatokat humánus módon el lehet pusztítani. A vizsgált anyagokat nem szabad olyan módon adagolni, amelyről ismert, hogy jelentős szenvedést és fájdalmat okoz maró vagy irritatív tulajdonsága miatt.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napig a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással csoportokba kell osztani. A vizsgálat előtt körülbelül 24 órával el kell távolítani a szőrzetet az állatok törzsének hátulsó területéről nyírással vagy borotválással. A szőrzet nyírásakor vagy borotválásakor óvatosan kell eljárni, nehogy olyan bőrsérülést okozzanak, ami a felszívódást befolyásolhatja. A testfelület legalább 10 %-át szabaddá kell tenni a vizsgált anyag alkalmazásához. Ha szilárd anyagot vizsgálnak, amelyet adott esetben porítani is lehet, az anyagot vízzel kellően át kell nedvesíteni, vagy szükség esetén vivőanyagot kell alkalmazni annak biztosítására, hogy jól tapadjon a bőrhöz. Vivőanyag használatakor figyelembe kell venni a vivőanyag hatását a vizsgált anyag bőrbe való behatolására. A folyékony vizsgált anyagokat rendszerint hígítás nélkül kell adagolni.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

1.6.2.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Kifejlett patkány vagy nyúl használható. Más faj is használható, de azok használatát meg kell indokolni. Kísérleti célokra tenyésztett, laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya minimálisan, az átlagértéktől maximum ± 20 %-kal térhet el egymástól.

▼B

1.6.2.2. *Az állatok száma és neme*

Minden koncentrációnál legalább öt állatot kell vizsgálni. Az állatoknak azonos neműnek kell lenniük. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Amennyiben rendelkezésre áll olyan információ, amely szerint valamelyik nem lényegesen érzékenyebben reagál, akkor ilyen nemű állatokat kell alkalmazni.

Megjegyzés: A rágcsálóknál magasabb rendű állatokkal végrehajtott akuttoxicitás-vizsgálatokban meg kell fontolni kisebb számú állat használatának lehetőségét. A dózisokat gondosan kell kiválasztani, és minden erőfeszítést meg kell tenni arra, hogy azok ne lépjék túl a közepesen toxikus dózisokat. Ilyen vizsgálatoknál el kell kerülni a vizsgált anyag letális dózisának beadását.

1.6.2.3. *Dózisok*

E szinteknek elegendő számúaknak, legalább háromnak, és megfelelően elosztottnak kell lenniük ahhoz, hogy a vizsgált csoportokban toxikus hatások és halálozási arányok egész sorát hozzák létre. Minden irritatív vagy maró hatást figyelembe kell venni a dózisok megállapításakor. Az adatoknak elegendőnek kell lenniük a koncentráció/hatás görbe létrehozására, és ahol lehetséges, lehetővé kell tenniük az LD_{50} elfogadható meghatározását.

1.6.2.4. *Határérték-vizsgálat*

A határérték-vizsgálatot el lehet végezni egyetlen, legalább 2 000 mg/testsúly kg dózissal adagolt 5 hím és 5 nőstény rágcsálóból álló csoporttal a fent leírt eljárások végrehajtásával. Ha a vizsgált anyaggal kapcsolatos halálozás figyelhető meg, akkor szükség lehet a teljes körű vizsgálat elvégzésére.

1.6.2.5. *Megfigyelési időszak*

A megfigyelési időszaknak legalább 14 napnak kell lennie. Azonban a megfigyelés időtartamát nem kell szigorúan értelmezni. Ezt a toxikus reakciók megjelenésének módja, a tünetek megjelenésének időpontja és a felépülési időtartam hosszúsága alapján kell meghatározni; ebből következően ezen időtartam szükség esetén meghosszabbítható. Fontos az az időpont, amikor a toxicitás jelei megjelennek és eltűnnek, valamint a halál bekövetkezésének ideje, különösen, ha tendencia figyelhető meg a halál késedelmes bekövetkezésére.

1.6.3. **A kísérlet végrehajtása**

Az állatokat egyesével kell a ketrecekben elhelyezni. A vizsgált anyagot a testfelület megközelítőleg 10 %-át kitevő felületen egyenletesen elosztva kell felvinni az állat bőrére. Erősen mérgező anyagoknál a felület lehet ennél kisebb, de a felület lehető legnagyobb részét a lehető legvékonyabb és legegyenletesebb bevonattal kell ellátni.

A 24 órás expozíció ideje alatt a vizsgált anyagot a bőrrel porózus gézkötés és nem irritáló ragtapasszal kell érintkezésben tartani. A vizsgált területet megfelelő módon be kell fedni, azért hogy megmaradjon rajta a vizsgált anyag és a gézkötés, és az állatok ne nyalhassák le a vizsgált anyagot. Mozgásgátló szerkezeteket lehet használni annak megakadályozására, hogy az állat a vizsgált anyagot lenyelje, de a teljes immobilizáció mint módszer nem javasolt.

▼B

Az expozíciós idő leteltével a maradék vizsgált anyagot lehetőség szerint el kell távolítani a bőr felületének vízzel vagy más megfelelő módon történő megtisztítása útján.

A megfigyeléseket szisztematikusan fel kell jegyezni. Külön feljegyzést kell vezetni minden egyes állatról. Az első nap során gyakran kell végrehajtani a megfigyeléseket. Minden munkanapon legalább egyszer gondos klinikai vizsgálatot kell végrehajtani, más megfigyeléseket naponta kell végezni, azon megfelelő tevékenységek végrehajtása mellett, amelyek célja a vizsgálatban részt vevő állatok elhullásának minimalizálása, ilyen például a holtan talált állatok boncolása vagy lehűtése, vagy a gyenge vagy haldokló állatok elkülönítése vagy elpusztítása.

A megfigyeléseknek ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a kezelt bőrfelület, a szem és a nyálkahártya, valamint a légző- és keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszeri funkciók, valamint a szomatomotoros aktivitás és viselkedési minta változásaira. Külön figyelmet kell szentelni a remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma megfigyelésére. A halál időpontját a lehető legpontosabban kell feljegyezni. A vizsgálat során elpusztult állatokat és a vizsgálat befejezéséig életben maradt állatokat fel kell boncolni. Fel kell jegyezni minden jelentős patológiás elváltozást. Amennyiben szükséges, szövetmintákat kell venni a kórszövettani vizsgálathoz.

Toxicitás meghatározása a másik nemnél

Az egyik nemmel végzett vizsgálat befejezése után a másik nemből kiválasztott, legalább öt állatból álló csoport számára kell adagolni az anyagot annak megállapítására, hogy az e nemhez tartozó állatok nem érzékenyebbek-e jelentősebb mértékben a vizsgált anyagra. Bizonyos esetekben indokolható lehet kevesebb állat használata. Ahol megfelelő információ áll rendelkezésre annak bizonyítására, hogy a vizsgált nemhez tartozó állatok jelentősen érzékenyebbek, elhagyható a másik nemhez tartozó állatokkal végzett vizsgálat.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, megadva minden egyes csoportnál az állatok számát a vizsgálat kezdetekor, az egyes állatok halálának időpontját, a toxicitás más jeleit mutató állatok számát, a toxikus hatások leírását és a boncolási leleteket. Egyenként meg kell határozni az állatok tömegét, és fel kell ezt jegyezni röviddel a vizsgált anyag beadása előtt, ezután minden héten és a halál bekövetkeztekor; ki kell számítani és fel kell jegyezni a tömegváltozásokat, ha az állat egy napnál tovább maradt életben. A vizsgált anyaggal összefüggő szenvedés és fájdalom miatt humánusan elpusztított állatok halálát az anyaggal kapcsolatos halálként kell feljegyezni. Az LD_{50} valamely elismert módszer segítségével határozható meg.

Az értékelésnek tartalmaznia kell – amennyiben ez lehetséges – a dózis és a rendellenességek fellépése és súlyossága közötti kapcsolatot, ideértve a magatartási rendellenességeket, a klinikai tüneteket, a jelentős sérüléseket, testsúlyváltozásokat, a halálozást és minden más toxikus tünetet is.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

▼B

— a használt fajt, törzset, az állatok származását, a tartási körülményeket, az étrendet stb.,

— a vizsgálati körülményeket (beleértve a bőrtisztítás módszerét és a kötszer típusát: zárt vagy nem zárt),

— a dózisokat (beleértve a vivőanyagot is, ha van és koncentrációk),

— a kezelt állatok nemét,

— az adatok táblázatos összefoglalását nem és koncentráció szerint (azaz a vizsgálat során elhullott vagy elpusztított állatok száma; a toxicitás jeleit mutató állatok száma; az exponált állatok száma),

— az anyag adagolása során vagy azt követően bekövetkező halál időpontját, az állatok humánus elpusztításának okait és kritériumait,

— minden megfigyelést,

— a 14 napban meghatározott teljes vizsgálat alá vont nemnél kapott LD_{50}- érték (az alkalmazott számítási módszer megadásával),

— az LD_{50}-hez tartozó 95 %-os konfidenciaintervallumot (ahol ez megadható),

— a dózis/mortalitás görbét és ennek meredekségét (ahol ezt megengedi a meghatározás módszere),

— a boncolási leleteket,

— a kórszövettani vizsgálatok eredményeit,

— a másik nemmel végrehajtott vizsgálatok eredményeit,

— az eredmények kiértékelését (külön figyelmet kell szentelni annak a hatásnak, amelyet a vizsgálat során az állatok humánus leölése gyakorolhat a kiszámított LD_{50}-értékre),

— az eredmények értelmezését.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. **SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

▼M8

B.4. AKUT BŐRIRRITÁCIÓ/BŐRKORRÓZIÓ

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 404. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozó OECD-iránymutatás rendszeres időközönként felülvizsgálat tárgyát képezi annak biztosítása érdekében, hogy tükrözze a rendelkezésre álló legjobb tudományos ismereteket. Az OECD 404. vizsgálati iránymutatásának felülvizsgálata során kiemelt figyelmet szenteltek az állatjóléti szempontokkal kapcsolatos lehetséges jobbító beavatkozásoknak és a vizsgálati vegyi anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló összes információ kiértékelésének, hogy ezáltal elkerülhető legyen a laboratóriumi állatokon történő szükségtelen kísérletezés. Az OECD (eredetileg 1981-ben elfogadott, majd 1992-ben, 2002-ben és 2015-ben átdolgozott) 404. vizsgálati iránymutatásának frissített kiadása hivatkozik a bőrirritáció/bőrkorrózió vonatkozásában végzett vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló iránymutatásra (1), amely a bőrirritációs és bőrkorróziós vizsgálatok moduláris megközelítésére tesz javaslatot. Az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés több, információforrásokat és adatelemző eszközöket csoportosító modult ismertet, továbbá i. iránymutatást nyújt arra nézve, hogy miként integrálhatók és használhatók az ismert vizsgálati és nem vizsgálati eredetű adatok a vegyi anyagok potenciális bőrirritációs és bőrkorróziós hatásainak felmérésére, és ii. javaslatot tesz a további vizsgálatok szükségességekor alkalmazható megközelítésre (1). Emellett az iránymutatás javasolja, hogy – amennyiben szükséges – az előzetes *in vivo* vizsgálat során az állatra ne egyszerre, hanem időben egymás után helyezzék fel a három teszttapaszt.

2. A bőrirritáció és a bőrkorrózió fogalommeghatározása a vizsgálati módszer függelékében szerepel.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

3. A tudományos észszerűség és az állatok kímélete érdekében nem szabad *in vivo* vizsgálatokat végezni mindaddig, amíg a vizsgálati vegyi anyag potenciális bőrkorróziós/bőrirritációs hatására vonatkozó összes rendelkezésre álló adatra el nem végezték a bizonyítékok súlyán alapuló (WoE) elemzést a bőrirritáció/bőrkorrózió vonatkozásában végzett vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló iránymutatás szerint, vagyis az iránymutatás három részének és az azokhoz tartozó moduloknak megfelelően (1). Röviden: az 1. rész az ismert adatokkal foglalkozik hét modulon keresztül, amelyek lefedik a humán adatokat, az *in vivo* adatokat, az *in vitro* adatokat, a fizikai-kémiai tulajdonságokkal kapcsolatos adatokat (pl. a pH-értéket, különösen az erős savasságot vagy lúgosságot) és a nem vizsgálatalapú módszereket. A 2. rész az adatok WoE-elemzésének elvégzését írja le. Amennyiben a WoE-elemzés nem meggyőző, tovább kell haladni a 3. rész szerint, amelynek során további vizsgálatokat kell végezni, először *in vitro* módszerekkel, majd legvégső esetben *in vivo* vizsgálatokkal. Az elemzés célja tehát az, hogy csökkentse az *in vivo* bőrkorróziós/bőrirritációs vizsgálatokat azon vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyekre az említett két végpont tekintetében más vizsgálatokból már elegendő bizonyíték áll rendelkezésre.

AZ IN VIVO VIZSGÁLAT ELVE

4. A vizsgálati vegyi anyagot egyetlen dózisban kell alkalmazni a kísérleti állat bőrén; a vizsgált állat nem kezelt bőrfelületei szolgálnak kontrollként. Az irritáció/korrózió mértékét meghatározott időközönként kell ellenőrizni és értékelni, továbbá a hatások teljes kiértékelése érdekében részletesebben is ismertetni. A vizsgálat időtartamának elég hosszúnak kell lennie ahhoz, hogy meg lehessen határozni a megfigyelt hatások visszafordíthatóságát vagy visszafordíthatatlanságát.

▼M8

5. A vizsgálat bármely fázisában tartósan súlyos stressz és/vagy fájdalom jeleit mutató állatokat kíméletesen le kell ölni, és a vizsgálati vegyi anyagot ennek megfelelően kell értékelni. Az elhullás közelében lévő és súlyosan szenvedő állatok kíméletes leölésére vonatkozó döntés kritériumai külön iránymutatás (2) tárgyát képezik.

AZ IN VIVO VIZSGÁLAT ELŐKÉSZÍTÉSE

Az állatfaj kiválasztása

6. A preferált laboratóriumi állatfaj az albínó nyúl, és egészséges, fiatal felnőtt állatokat kell használni. Más fajok alkalmazását megfelelően indokolni kell.

Az állatok előkészítése

7. A vizsgálat előtt körülbelül 24 órával el kell távolítani az állat szőrzetét úgy, hogy teljesen le kell nyírni az állat törzsének dorzális területét. Ügyelni kell arra, hogy eközben ne dörzsölődjön ki az állat bőre, és csak olyan állatokat szabad használni, amelyek bőre ép és egészséges.

8. Egyes nyúltörzsek szőrzete sűrű foltokban nő, amelyek az év egyes szakaszaiban még szembetűnőbbek. Az ilyen sűrű szőrzetnövekedéssel jellemzett részeket nem szabad vizsgálati területként használni.

Tartási és etetési körülmények

9. Az állatokat egyenként kell elhelyezni. Nyulak esetében a kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének 20 °C-nak (± 3 °C) kell lennie. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és az – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem haladhatja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltakozásával. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása

10. A vizsgálati vegyi anyagot egy kis (körülbelül 6 cm^2-es) bőrterületre kell kijuttatni, majd egy géztapasszal le kell takarni, és nem irritáló ragasztószalaggal kell a helyén rögzíteni. Olyan esetekben, amikor a közvetlen alkalmazás nem megoldható (pl. folyadékok vagy egyes masszák esetében), a vizsgálati vegyi anyagot először a géztapaszra kell felvinni, és azután azt kell a bőrre helyezni. Az expozíciós idő tartamára a tapaszt lazán kell a bőrre rögzíteni egy megfelelő, félig záró kötés alkalmazásával. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyagot a tapaszra viszik fel, azt úgy kell a bőrre rögzíteni, hogy megfelelő legyen a kontaktus, és a bőrön egyenletes legyen az anyag eloszlása. Gondoskodni kell arról, hogy az állat ne férhessen hozzá a tapaszhoz és ne nyelhesse le vagy lélegezhesse be a vizsgálati vegyi anyagot.

11. A folyékony vizsgálati vegyi anyagok adagolása rendszerint hígítás nélkül történik. Szilárd anyagok vizsgálatakor (amelyeket szükség esetén porrá lehet őrölni) a vizsgálati vegyi anyagot a lehető legkisebb, de a bőrrel való megfelelő kontaktus biztosításához a lehető legkisebb mennyiségű vízzel (vagy szükség esetén más megfelelő vivőanyaggal) kell nedvesíteni. Ha vivőanyagként nem vizet alkalmaznak, annak lehetőleg ne, vagy csak minimális bőrirritáló hatása legyen.

12. Ha megoldható, az általában 4 órás expozíciós idő végén az adott esetben megmaradt vizsgálati vegyi anyagot vízzel vagy megfelelő oldószerrel el kell távolítani, ügyelve arra, hogy ez ne befolyásolja a meglévő válaszreakciókat vagy a felhám épségét.

▼M8

Dózis

13. A vizsgálat helyére 0,5 ml folyadékot vagy 0,5 g szilárd anyagot vagy pasztát kell felvinni.

Előzetes vizsgálat (*in vivo* bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálat egy állat felhasználásával)

14. Ha a bizonyítékok súlyán alapuló elemzés vagy korábbi *in vitro* vizsgálat alapján a vizsgálati vegyi anyag korróziós vagy irritáló hatásúnak minősül, illetve nem osztályozandó, általában nincsen szükség további *in vivo* vizsgálatokra. Amennyiben azonban indokoltnak látszik a további adatgyűjtés, az *in vivo* vizsgálatot először egy állaton kell elvégezni, az alábbi eljárás alkalmazásával. Az állatra egymást követően legfeljebb három teszttapaszt lehet felhelyezni. Az első tapaszt három perc után kell eltávolítani. Ha nem láthatók súlyos bőrreakciók, egy második tapaszt helyeznek fel egy másik helyre, majd egy óra elteltével eltávolítják. Ha a megfigyelések ebben a szakaszban azt mutatják, hogy humánusan megengedhető az expozíció négy órára történő meghosszabbítása, egy harmadik tapaszt is fel lehet helyezni, melyet négy óra múlva eltávolítanak és a válaszreakciót kiértékelik.

15. Ha a három egymás utáni expozíció bármelyike után korróziós hatás tapasztalható, a vizsgálatot azonnal be kell fejezni. Ha az utolsó tapasz eltávolítása után sem figyelhető meg korróziós hatás, az állatot 14 napon át meg kell figyelni, kivéve, ha előbb jelentkezik korróziós hatás.

16. Azokban az esetekben, amikor a vizsgálati vegyi anyag várhatóan nem okoz korróziós hatást, de irritáló lehet, egyetlen tapaszt kell felhelyezni egy állatra, négy óra időtartamra.

Megerősítő vizsgálat (*in vivo* bőrirritációs vizsgálat további állatok felhasználásával)

17. Ha az előzetes vizsgálat során nem figyelhető meg korróziós hatás, legfeljebb további két állaton egy-egy tapasz és négyórás expozíciós idő alkalmazásával meg kell erősíteni az irritációt vagy a negatív válaszreakciókat. Ha az előzetes vizsgálat során irritációs válasz figyelhető meg, a megerősítő vizsgálat lépcsőzetesen vagy két további állat párhuzamos kezelésével is elvégezhető. Abban a kivételes esetben, ha nem végeznek előzetes vizsgálatot, két vagy három állatot lehet kezelni egy-egy tapasszal, amelyet négy óra múlva kell eltávolítani. Ha két állat használata esetén mindkettő ugyanolyan válaszreakciót mutat, további vizsgálatokra nincs szükség. Egyéb esetben egy harmadik állatot is be kell vonni a vizsgálatba. A nem egyértelmű válaszreakciókat esetlegesen további állatok bevonásával lehet értékelni.

Megfigyelési időszak

18. A megfigyelési időszak hosszát úgy kell megválasztani, hogy elegendő legyen a megfigyelt hatások visszafordíthatóságának teljes kiértékelésére. A vizsgálatot azonban azonnal meg kell szakítani, ha az állat tartósan súlyos fájdalom vagy stressz jeleit mutatja. A hatások visszafordíthatóságának meghatározásához az állatokat a tapaszok eltávolítása után legfeljebb 14 napig meg kell figyelni. Ha a visszafordíthatóság a 14 napos időszak vége előtt bebizonyosodik, a kísérletet ekkor kell befejezni.

Klinikai megfigyelések és a bőrreakciók értékelése

19. Minden állatnál meg kell vizsgálni a bőrpír (eritéma) vagy vizenyő (ödéma) jeleit és a válaszreakciókat a tapasz eltávolítása után 60 perccel, majd 24, 48 és 72 órával értékelni kell. Az egy állattal végzett előzetes vizsgálatban a vizsgálati területet a tapasz eltávolítása után azonnal is meg kell vizsgálni. A bőrreakciókat a csatolt táblázatban megadottak szerint kell értékelni és feljegyezni. Ha 72 óra elteltekor sem irritációként, sem korrózióként nem értékelhető bőrkárosodás látható, a hatások visszafordíthatóságának meghatározásához szükség lehet a megfigyelések folytatására a 14. napig. Az irritáció

▼M8

megfigyelésén kívül minden lokális toxikus hatást, mint például a bőr zsírtartalmának csökkentését, és bármely káros szisztémás hatást (pl. a mérgezés klinikai tüneteire és a testtömegre gyakorolt hatást) részletesen le kell írni és fel kell jegyezni. A nem egyértelmű válaszreakciók tisztázása érdekében fontolóra kell venni kórszövettani vizsgálatok elvégzését is.

20. A bőrreakciók értékelése elkerülhetetlenül szubjektív. A bőrreakciók értékelésének harmonizálása és a vizsgáló laboratóriumok, illetve a megfigyelésekben és azok értékelésében részt vevők segítése érdekében a megfigyeléseket végző személyzetet megfelelően ki kell képezni az alkalmazott értékelő rendszer (lásd a csatolt táblázatot) használatára. Hasznos lehet egy, a bőrirritációk és más léziók értékelését ismertető, illusztrált útmutató is (3).

ADATOK ÉS JELENTÉS

21. A végleges vizsgálati jelentésben a vizsgálatok eredményeit táblázatos formában kell összefoglalni, amelynek a 24. pontban felsorolt tételek mindegyikét tartalmaznia kell.

Az eredmények értékelése

22. A bőrirritációs pontszámokat a léziók jellegével és súlyosságával, illetve visszafordíthatóságával vagy visszafordíthatatlanságával összefüggésben kell értékelni. Az egyes pontszámok nem jelentenek abszolút normát egy anyag irritációs tulajdonságai tekintetében, mivel a vizsgálandó anyag egyéb hatásait is értékelni kell. Az egyes pontszámokat ehelyett referenciaértékeknek kell tekinteni, amelyeket a vizsgálat során tett összes egyéb megfigyeléssel együttesen kell értékelni.

23. Az irritációs válaszreakciók értékelésekor figyelembe kell venni a bőrléziók visszafordíthatóságát. Ha az olyan válaszreakciók, mint a szőrhiány (korlátozott területen), a kóros elszarusodás (hiperkeratózis), a szövetszaporodás (hiperplázia) vagy a hámlás a 14 napos megfigyelési időszak végére sem múlnak el, a vizsgálati vegyi anyagot irritálónak kell tekinteni.

Vizsgálati jelentés

24. A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Az in vivo vizsgálatok indokolása:

— A korábban rendelkezésre álló vizsgálati adatok WoE-elemzése, beleértve a lépcsőzetes vizsgálati stratégia során nyert adatokat is:

— a korábbi vizsgálatokból rendelkezésre álló, vonatkozó adatok ismertetése;

— a vizsgálati stratégia egyes szakaszaiban nyert adatok;

— az elvégzett *in vitro* vizsgálatok, ezen belül az eljárások, illetve a vizsgált anyaggal és a referenciaanyagokkal kapott eredmények részleteinek ismertetése;

— WoE-elemzés az *in vivo* vizsgálat elvégzéséhez.

Vizsgálati vegyi anyag:

— Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;

▼**M8**

— ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, több összetevőből álló anyagok és keverékek, valamint komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok (UVCB-k): lehetőség szerint az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai alapján jellemezve;

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— eredet, gyártási szám, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag/kontrollanyag kezelése a vizsgálatot megelőzően, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, felhasználási határideje vagy ismételt elemzésének napja, ha ismert;

— tárolási feltételek.

Vivőanyag:

— azonosítás, (adott esetben) koncentráció, alkalmazott térfogat;

— a vivőanyag megválasztásának indokolása.

Kísérleti állat(ok):

— a felhasznált faj/törzs, adott esetben az albínó nyúltól eltérő faj(ok) alkalmazásának indokolása;

— az állat(ok) száma nemenként;

— az egyes állatok testtömege a vizsgálat előtt és annak befejezésekor;

— életkor a vizsgálat kezdetén;

— az állat(ok) származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.

Vizsgálati körülmények:

— az állat azon testrészének előkészítése, ahová felhelyezik a tapaszt;

— a felhasznált tapasz típusának és a tapaszolási eljárásnak a részletes leírása;

— a vizsgálati vegyi anyag előkészítésének, alkalmazásának és eltávolításának részletes ismertetése.

Eredmények:

— az irritációs/korróziós válasz pontszámainak táblázatos formában történő megadása minden egyes állatra és minden egyes mérési időpontra vonatkozóan;

— az összes megfigyelt lézió ismertetése;

— a megfigyelt irritáció vagy korrózió jellegének és mértékének, illetve az esetleges kórszövettani eredményének a leíró jellegű ismertetése;

— a bőrirritáción és -korrózión kívüli egyéb káros lokális hatások (pl. a bőr zsírtartalmának csökkenése) és szisztémás hatások ismertetése.

▼**M8**

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

▼M8

Táblázat

A Bőrreakciók Értékelése

Bőrpír (eritéma) és pörkképződés

Nincs bőrpír…	0
Nagyon enyhe bőrpír (alig észlelhető)….	1
Jól kifejezett bőrpír…	2
Közepes–súlyos mértékű bőrpír…	3
Pörkképződésig fokozódó súlyos bőrpír (céklavörös szín), amely lehetetlenné teszi a bőrpír osztályozását…	4

Elérhető maximális pontszám: 4

Vizenyőképződés

Nincs vizenyő…	0
Nagyon enyhe vizenyő (alig észlelhető)…	1
Enyhe vizenyő (a terület szélei az egyértelmű kiemelkedések miatt jól kifejezettek)…	2
Közepes súlyosságú vizenyő (körülbelül 1 mm-re emelkedik ki)…	3
Súlyos vizenyő (több mint 1 mm-re emelkedik ki és nagyobb, mint az expozíciós terület)…	4

Elérhető maximális pontszám: 4

A nem egyértelmű válaszreakciókat kórszövettani vizsgálattal lehet tisztázni.

▼**M8**

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Bőrirritáció: a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően 4 órán belül megjelenő, visszafordítható bőrkárosodás.

Bőrkorrózió: a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően négy órán belül megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, azaz a felhámon át az irhára is átterjedő, látható szövetelhalás. A korróziós reakciót jellemzően fekélyek, vérzés, véres var, illetve a 14 napos megfigyelési időszak végén a bőr kifehéredése miatti elszíneződések, teljesen szőrtelen területek és hegek jellemzik. A kérdéses lézió értékeléséhez figyelembe kell venni a kórszövettant.

Vizsgálati vegyi anyag: az e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

▼M7

B.5. AKUT SZEMIRRITÁCIÓ/SZEMKORRÓZIÓ

BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 405. vizsgálati iránymutatásában (2012) leírt módszerrel. A vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozó OECD-iránymutatás rendszeres időközönként felülvizsgálat tárgyát képezi annak biztosítása érdekében, hogy tükrözze a rendelkezésre álló legjobb tudományos ismereteket. E vizsgálati iránymutatás korábbi felülvizsgálatai során különleges figyelmet fordítottak a vizsgálati vegyi anyagra vonatkozó összes információ értékelésével történő lehetséges javításokra, hogy elkerülhető legyen a laboratóriumi állatokon történő szükségtelen kísérletezés, és ezáltal tiszteletben lehessen tartani az állatjóléti szempontokat. A(z 1981-ben elfogadott és 1987-ben, 2002-ben és 2012-ben frissített) 405. vizsgálati iránymutatásban szerepel az az ajánlás, hogy az akut szemirritáció/szemkorrózió vizsgálatára előírt *in vivo* vizsgálat elvégzése előtt el kell végezni a rendelkezésre álló adatok bizonyító erejének elemzését (1). Ha nem áll rendelkezésre elegendő adat, azok mennyiségét ajánlott lépcsőzetes vizsgálatok alkalmazásával növelni (2) (3). A vizsgálati stratégia részét képezi validált és elfogadott *in vitro* vizsgálatok végzése, amelyek e vizsgálati módszer kiegészítésében kerülnek ismertetésre. A vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK rendelet ([1]) alkalmazásában integrált vizsgálati stratégia is szerepel a vonatkozó ECHA-iránymutatásban (21). Állatkísérletek csak akkor végezhetők, ha a rendelkezésre álló alternatív módszerek figyelembevételét, valamint a megfelelőnek ítélt módszerek alkalmazását követően megállapítást nyert a szükségességük. E frissített vizsgálati módszer szövegezésekor vannak olyan esetek, amikor e vizsgálati módszer alkalmazása továbbra is szükséges, vagy azt egyes szabályozási keretek előírják.

A legutóbbi frissítés elsősorban a fájdalomcsillapítók és az érzéstelenítők használatára összpontosított, azonban nem befolyásolta a vizsgálati iránymutatás alapvető koncepcióját és felépítését. Az ICCVAM ([2]) és egy független nemzetközi szakértői értékelő testület felülvizsgálta a helyi fájdalomcsillapítók, a szisztémás hatású érzéstelenítők és a kíméletes végpontok rutinszerű alkalmazásának hasznosságát és korlátozásait a szemirritáció *in vivo* biztonsági vizsgálata során (12). A felülvizsgálat megállapította, hogy a helyi fájdalomcsillapítók és a szisztémás hatású érzéstelenítők alkalmazásával a vizsgálat kimenetelének befolyásolása nélkül kiküszöbölhető a fájdalom és a szorongás nagy része vagy egésze, és azt javasolta, hogy ezeket az anyagokat mindig használják. Ez a vizsgálati módszer figyelembe veszi ezt a felülvizsgálatot. A helyi fájdalomcsillapítókat, a szisztémás hatású érzéstelenítőket és a kíméletes végpontokat rutinszerűen kell alkalmazni az akut szemirritáció és -korrózió *in vivo* vizsgálata során. Az alkalmazásuk alóli kivételeket meg kell indokolni. Az e módszer keretében ismertetett pontosítások lényegesen csökkenteni fogják, illetve kiküszöbölik az állatok fájdalmát és szorongását a legtöbb olyan vizsgálati helyzetben, amelyben az *in vivo* szembiztonsági vizsgálat továbbra is szükséges.

A kiegyensúlyozott előzetes fájdalomcsillapításnak magában kell foglalnia i. egy helyi fájdalomcsillapítóval (például proparakainnal vagy tetrakainnal) és egy szisztémás hatású érzéstelenítővel (például buprenorfinnal) végzett rutinszerű előkezelést, ii. (például buprenorfinnal és meloxicammal kiváltott) szisztémás fájdalomcsillapítás rutinszerű utókezelési ütemtervét, iii. az állatoknál esetlegesen jelentkező fájdalom és/vagy szorongás klinikai tüneteinek tervezett megfigyelését, nyomon követését és rögzítését, továbbá iv. valamennyi szemlézió jellegének, súlyosságának és alakulásának tervezett megfigyelését, nyomon követését és

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 2006. december 18-i 1907/2006/EK rendelete a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH), az Európai Vegyianyag-ügynökség létrehozásáról, az 1999/45/EK irányelv módosításáról, valamint a 793/93/EGK tanácsi rendelet, az 1488/94/EK bizottsági rendelet, a 76/769/EGK tanácsi irányelv, a 91/155/EGK, a 93/67/EGK, a 93/105/EK és a 2000/21/EK bizottsági irányelv hatályon kívül helyezéséről. HL L 304., 2007.11.22., 1. o.

([2]) Az USA alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottsága.

▼M7

rögzítését. További részletek az alábbiakban ismertetett frissített eljárásokban találhatók. A vizsgálat zavarásának elkerülése érdekében a vizsgálati vegyi anyag beadását követően további helyi fájdalomcsillapítók vagy érzéstelenítők nem alkalmazhatók. Gyulladásgátló hatású fájdalomcsillapítók (például meloxicam) nem alkalmazhatók helyileg, és a szisztémásan alkalmazott dózisok nem zavarhatják a szemre gyakorolt hatásokat.

A fogalommeghatározások a vizsgálati módszer függelékében szerepelnek.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

A tudományos ésszerűség és az állatok kímélete érdekében nem szabad *in vivo* vizsgálatokat végezni mindaddig, amíg a vegyi anyag potenciális szemkorróziós/szemirritáló hatására vonatkozó összes rendelkezésre álló adatra vonatkozóan el nem végezték az adatok bizonyító erejének elemzését. Ilyen adatok az embereken és/vagy laboratóriumi állatokon elvégzett vizsgálatok eredményei, egy vagy több, szerkezetileg rokon anyag vagy keverékeik szemkorróziós/szemirritáló hatásaival kapcsolatos bizonyítékok, a vegyi anyag nagymértékű savasságát vagy lúgosságát igazoló adatok (4) (5), valamint a bőrkorrózióra és szemkorrózióra/-irritációra irányuló validált és elfogadott *in vitro* vagy *ex vivo* vizsgálatokból kapott eredmények (6) (13) (14) (15) (16) (17). Előfordulhat, hogy a vizsgálatokat már az adatok bizonyító erejének elemzése előtt elvégezték, vagy éppen annak eredményeként végzik el.

Bizonyos vegyi anyagok esetében az ilyen elemzés annak szükségességét jelezheti, hogy el kell végezni a vegyi anyag szemkorróziós/szemirritációs potenciáljának *in vivo* vizsgálatát. Minden ilyen esetben az *in vivo* szemvizsgálat alkalmazásának tervbevétele előtt először lehetőleg a vegyi anyag *in vitro* és/vagy *in vivo* bőrkorróziós hatásainak vizsgálatát kell elvégezni, és azt a B.4. vizsgálati módszeren belüli lépcsőzetes vizsgálati stratégiának (7) vagy az ECHA-iránymutatásban ismertetett integrált vizsgálati stratégiának (21) megfelelően kell kiértékelni.

A lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amely magában foglalja validált *in vitro* vagy *ex vivo* szemkorróziós/szemirritációs vizsgálatok elvégzését is, e vizsgálati módszer kiegészítésében és – a REACH alkalmazásában – az ECHA-iránymutatásban (21) kerül ismertetésre. Az *in vivo* vizsgálatok elvégzése előtt ilyen vizsgálati stratégia követése javasolt. Új vegyi anyagok esetében lépcsőzetes vizsgálati megközelítés javasolt a vegyi anyag korróziós/irritáló hatásaira vonatkozó, tudományos szempontból megfelelő adatok gyűjtésére. Ismert vegyi anyagok esetében, ha nem áll rendelkezésre elegendő adat a bőrkorróziós/bőrirritáló és szemkorróziós/szemirritáló hatásokról, e stratégia alkalmazásával pótolhatók a hiányzó adatok. Megfelelően meg kell indokolni, ha ettől eltérő vizsgálati stratégiát vagy eljárást alkalmaznak, vagy ha úgy döntenek, hogy nem használják a lépcsőzetes vizsgálati megközelítést.

AZ *IN VIVO* VIZSGÁLAT ELVE

Szisztémás hatású fájdalomcsillapítóval történő előkezelést és megfelelő helyi érzéstelenítők alkalmazását követően a vizsgálandó vegyi anyagot egyetlen dózisban kell alkalmazni a kísérleti állat egyik szemén; a nem kezelt szem szolgál kontrollként. A szemirritáció/szemkorrózió mértékét meghatározott időközönként a kötőhártya, a szaruhártya és a szivárványhártya lézióinak pontozásával kell kiértékelni. A hatások teljes kiértékelése érdekében részletesen ismertetni kell a szemre gyakorolt egyéb hatásokat és a káros szisztémás hatásokat is. A vizsgálat időtartamának elég hosszúnak kell lennie ahhoz, hogy meg lehessen határozni a hatások visszafordíthatóságát vagy visszafordíthatatlanságát.

A vizsgálat bármely fázisában súlyos szorongás és/vagy fájdalom vagy az e vizsgálati módszerben (lásd a 26. pontot) ismertetett kíméletes végpontoknak megfelelő léziók jeleit mutató állatokat humánus módon el kell pusztítani, és a vegyi anyagot ennek megfelelően kell értékelni. Az elhullás közelében lévő és súlyosan szenvedő állatok humánus módon történő elpusztításáról szóló döntéssel kapcsolatos kritériumok OECD-iránymutatás (8) tárgyát képezik.

▼M7

AZ *IN VIVO* VIZSGÁLAT ELŐKÉSZÍTÉSE

A fajok kiválasztása

A preferált laboratóriumi állatfaj az albínó nyúl, és egészséges, fiatal, ivarérett állatokat kell alkalmazni. Más törzsek vagy fajok alkalmazását megfelelően meg kell indokolni.

Az állatok előkészítése

A vizsgálat megkezdése előtti 24 órában a vizsgálatra ideiglenesen kiválasztott kísérleti állat mindkét szemét meg kell vizsgálni. Szemirritációt, szemhibákat vagy korábban szerzett szaruhártya-sérülést mutató állatokat nem szabad használni.

Tartási és etetési körülmények

Az állatokat egyenként kell elhelyezni. Nyulak esetében a kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének 20 °C (± 3 °C)-nak kell lennie. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot; a célérték az 50–60 %. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. A túlzott fényerősség kerülendő. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

Helyi érzéstelenítők és szisztémás hatású fájdalomcsillapítók alkalmazása

A szembiztonsági vizsgálatok során jelentkező fájdalom és szorongás elkerülése, illetve minimálisra csökkentése érdekében az alábbi eljárások javasoltak. Más, helyettesítő eljárások is választhatók, amennyiben bizonyítottan ugyanolyan hatékonyan vagy hatékonyabban biztosítják a fájdalom és a szorongás elkerülését vagy enyhítését.

— A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása előtt hatvan perccel szubkután injekcióval 0,01 mg/kg buprenorfint kell beadni a szisztémás fájdalomcsillapítás terápiás szintjének biztosítása érdekében. A szisztémásan beadott buprenorfin és más hasonló, szisztémásan beadott ópiumtartalmú fájdalomcsillapítók esetében nem ismert, illetve nem várható, hogy megváltoztatják a szemreakciókat (12).

— A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása előtt öt perccel mindkét szemre egy vagy két csepp helyi érzéstelenítőt (pl. 0,5 % proparakain-hidrokloridot vagy 0,5 % tetrakain-hidrokloridot) kell alkalmazni. A vizsgálat esetleges zavarásának elkerülése érdekében tartósítószert nem tartalmazó helyi érzéstelenítő javasolt. A vizsgálati vegyi anyaggal nem, de helyi érzéstelenítővel kezelt állatok szeme szolgál kontrollként. Ha a vizsgálati vegyi anyag előreláthatólag jelentős fájdalmat és szorongást okoz, azt szokásosan nem szabad *in vivo* vizsgálni. Kétség felmerülése vagy a vizsgálat szükségessége esetén azonban mérlegelni kell a helyi érzéstelenítőnek a vizsgálati vegyi anyag alkalmazása előtti ötperces időközönkénti további alkalmazását. A felhasználóknak tisztában kell lenniük azzal, hogy a helyi érzéstelenítők többszöri alkalmazása kismértékben növelheti a vegyi anyagok okozta léziók súlyosságát és/vagy az e léziók megszűnéséhez szükséges időt.

— A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása után nyolc órával szubkután injekcióval 0,01 mg/kg buprenorfint és 0,5 mg/kg meloxicamot kell beadni a szisztémás fájdalomcsillapítás terápiás szintjének fenntartása érdekében. Bár nincsenek arra utaló adatok, hogy a meloxicam napi egyszeri szubkután beadása gyulladásgátló hatást fejtene ki a szemre, a vizsgálat esetleges zavarásának elkerülése érdekében meloxicam a vizsgálati vegyi anyag alkalmazása után legalább 8 óráig nem adható be (12).

— A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása utáni első 8 órás kezelést követően 12 óránként szubkután injekcióval 0,01 mg/kg buprenorfint, ezzel együtt 24 óránként szubkután injekcióval 0,5 mg/kg meloxicamot kell beadni, amíg a szemléziók be nem gyógyulnak, továbbá fájdalom és szorongás klinikai

▼M7

tünetei nem jelentkeznek. Rendelkezésre állnak olyan retard fájdalomcsillapító készítmények, amelyek használatát mérlegelni lehet a fájdalomcsillapító beadása gyakoriságának csökkentése érdekében.

— A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása után azonnal „mentő” fájdalomcsillapítást kell végezni, ha az előzetes fájdalomcsillapítás és a helyi érzéstelenítés nem megfelelő. Ha a vizsgálat során az állatok fájdalom és szorongás jeleit mutatják, a szubkután injekcióval 12 óránként beadott 0,01 mg/kg helyett szubkután injekcióval 0,03 mg/kg „mentő” buprenorfin-dózist kell azonnal beadni, és ezt szükség esetén 8 óránként meg kell ismételni. A „mentő” buprenorfin-dózissal együtt 24 óránként, szubkután injekcióval 0,5 mg/kg meloxicamot kell beadni, amely azonban a vizsgálati vegyi anyag alkalmazása után legalább 8 órán át nem adható be.

A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása

A vizsgálati vegyi anyagot az alsó szemhéj óvatos elhúzása után az állat egyik szemének kötőhártyazsákjába kell bejuttatni. Ezt követően körülbelül egy másodpercig óvatosan össze kell fogni a szemhéjakat, hogy az anyag ki ne essen vagy ki ne folyjon. A másik, nem kezelt szem kontrollként szolgál.

Öblögetés

A kísérleti állatok szemét a vizsgálati vegyi anyag becseppentése után legalább 24 órán át nem szabad kimosni, kivéve szilárd anyagok alkalmazása esetén (lásd a 18. pontot), illetve ha azonnali korróziós vagy irritáló hatások tapasztalhatók. Ha szükségesnek tűnik, 24 óra múlva ki lehet mosni az állatok szemét.

Nem javasolt kísérőcsoport alkalmazása a mosás hatásának vizsgálatára, kivéve, ha az tudományosan indokolt. Ha kísérőcsoport szükséges, akkor ehhez két nyulat kell használni. A mosás körülményeit, pl. a mosás időpontját, a mosóoldat összetételét és hőmérsékletét, a mosás időtartamát és sebességét, valamint az alkalmazott térfogatot részletesen dokumentálni kell.

Dózisszintek

(1) *Folyadékok vizsgálata*

Folyadékok vizsgálata esetén 0,1 ml-es dózist kell alkalmazni. Pumpás spray-ket nem szabad a vegyi anyag közvetlenül a szembe való permetezésére használni. A spray-t ki kell fújni, és tartalmát egy edényben össze kell gyűjteni, mielőtt 0,1 ml-t az állat szemébe cseppentenének.

(2) *Szilárd anyagok vizsgálata*

Szilárd anyagok, masszák és szemcsés vegyi anyagok vizsgálata esetén az alkalmazott mennyiségnek 0,1 ml térfogatúnak kell lennie, illetve tömege nem haladhatja meg a 100 mg-ot. A vizsgálati vegyi anyagot finom porrá kell őrölni. Térfogatmérés előtt óvatosan össze kell tömöríteni, pl. a mérőedény megkocogtatásával. Amennyiben az első megfigyelési időpontban, azaz a kezelés után 1 órával azt tapasztalják, hogy a szilárd vizsgálati vegyi anyagot a fiziológiai mechanizmusok nem távolították el a kísérleti állat szeméből, a szemet sóoldattal vagy desztillált vízzel ki lehet öblögetni.

(3) *Aeroszolok vizsgálata*

A szembe cseppentés előtt ajánlatos minden pumpás spray tartalmát és aeroszolt összegyűjteni. Az egyetlen kivételt ez alól a túlnyomásos aeroszolos flakonokban lévő vegyi anyagok képezik, amelyeket a párolgás miatt nem lehet összegyűjteni. Ilyen esetekben az állat szemét nyitva kell tartani, és a vizsgálati vegyi anyagot úgy kell a szembe juttatni, hogy a flakont 10 cm távolságban közvetlenül a szem előtt tartva és körülbelül egy másodpercig működtetve egyszer belefújnak az állat szemébe. A spray nyomásától és tartalmától függően a távolság ettől eltérő is lehet. Vigyázni kell arra, hogy a spray nyomása ne okozzon szemkárosodást. Megfelelő esetekben szükség lehet a spray ereje okozta „mechanikai” szemkárosodás lehetőségének figyelembevételére.

▼M7

Az aeroszol dózisa a vizsgálat következő módon végzett szimulációjával becsülhető meg: a vegyi anyagot mérőpapírra kell permetezni egy olyan, közvetlenül a papír elé helyezett nyíláson keresztül, amelynek mérete megegyezik a nyúl szemének méretével. A szembe permetezett mennyiség közelítő becslésére a papír tömegének növekedése használatos. Illékony vegyi anyagok esetében a dózist úgy lehet megbecsülni, hogy a vizsgálati vegyi anyag eltávolítása előtt és után is megmérik a befogadó edény tömegét.

Kiindulási vizsgálat (egy állat alkalmazásával végzett *in vivo* szemirritációs/szemkorróziós vizsgálat)

Kifejezetten javasolt, hogy az *in vivo* vizsgálatra először egy állat alkalmazásával kerüljön sor (lásd e vizsgálati módszer kiegészítését: Lépcsőzetes vizsgálati stratégia szemirritáció és szemkorróziós hatás vizsgálatához). A megfigyeléseknek lehetővé kell tenniük a súlyosság és a visszafordíthatóság meghatározását, mielőtt egy második állaton végzett megerősítő vizsgálatra kerülne sor.

Ha e vizsgálat eredményei szerint az ismertetett eljárás alkalmazásával a vegyi anyag korróziós hatású vagy súlyosan irritálja a szemet, nem szabad további szemirritációs vizsgálatokat végezni.

Megerősítő vizsgálat (további állatok alkalmazásával végzett *in vivo* szemirritációs vizsgálat)

Ha a kiindulási vizsgálat során nem figyelhető meg korróziós vagy súlyos irritáló hatás, legfeljebb további két állat alkalmazásával ellenőrizni kell az irritációs vagy negatív válaszreakciókat. Ha a kiindulási vizsgálat során irritációs válasz tapasztalható, a megerősítő vizsgálatot ajánlatos lépcsőzetesen, egyszerre egy állaton elvégezni a két további állat egyszerre történő expozíciója helyett. Ha a második állat korróziós vagy súlyos irritáló hatásokat mutat, a vizsgálatot nem szabad folytatni. Ha a második állat eredményei elegendőek a veszélyességi osztály meghatározásához, akkor további vizsgálatokat nem szabad folytatni.

Megfigyelési időszak

A megfigyelési időszak hosszát úgy kell megválasztani, hogy elegendő legyen a megfigyelt hatások mértékének és visszafordíthatóságának teljes kiértékelésére. A kísérletet azonban azonnal be kell fejezni, ha az állat súlyos fájdalom vagy szorongás jeleit mutatja (8). A hatások visszafordíthatóságának meghatározásához az állatokat általában a vizsgálati vegyi anyag alkalmazása után 21 napig kell megfigyelni. Ha a visszafordíthatóság a 21 napos időszak vége előtt bebizonyosodik, a kísérletet ekkor be kell fejezni.

Klinikai megfigyelések és a szemreakciók értékelése

A szemeket érintően a vizsgálati vegyi anyag alkalmazása után egy órával átfogó értékelést kell végezni arra nézve, hogy előfordulnak-e szemléziók vagy sem; ezt napi szintű értékelések követik. Az állatokat az első három napon naponta többször ki kell értékelni annak biztosítása érdekében, hogy a vizsgálat befejezésére vonatkozó döntések meghozatalára időben sor kerüljön. A kísérleti állatokon a vizsgálat teljes időtartama alatt legalább naponta kétszer, minimum 6 órás intervallumokkal, vagy szükség esetén gyakrabban kell rutinszerű értékelést végezni a fájdalom és/vagy szorongás klinikai tünetei szempontjából (pl. a szem többszöri tapogatása vagy dörzsölése, túlzott pislogás, túlzott könnyezés) (9) (10) (11). Az állatokat i. megfelelően meg kell vizsgálni abból a szempontból, hogy van-e fájdalomra vagy szorongásra utaló bizonyíték, annak érdekében, hogy megalapozott döntéseket lehessen hozni a fájdalomcsillapító-adagolás növelésének szükségességéről, valamint ii. abból a szempontból, hogy van-e megállapított kíméletes végpontokra utaló bizonyíték, annak érdekében, hogy megalapozott döntéseket lehessen hozni arról, hogy helyénvaló-e az állatokon humánus módon eutanáziát végrehajtani, továbbá biztosítani lehessen, hogy e döntések meghozatalára időben sor kerüljön. Fluoreszcein festést rutinszerűen kell alkalmazni, és megfelelőnek ítélt esetben a szemkárosodás kimutatására és mérése szolgáló segédeszközként, valamint a humánus eutanázia tekintetében megállapított végpont-kritériumok teljesülésének értékelésére réslámpás biomikroszkópot kell használni (pl. szaruhártya-fekélyesedés fennállása esetén megvizsgálva a sérülés

▼M7

mélységét). A megfigyelt léziókról készült digitális fényképek gyűjthetők referenciaként, valamint a szemkárosodási mérték tartós rögzítésének biztosítása érdekében. Ha már megvan a döntő információ, az állatokat nem szabad a szükségesnél hosszabb ideig a kísérletben tartani. A súlyos fájdalmat vagy szorongást mutató állatokat haladéktalanul és humánus módon el kell pusztítani, és a vegyi anyagot ennek megfelelően kell értékelni.

A becseppentés után az alábbi szemléziókat mutató állatokat humánus módon el kell pusztítani (a léziók fokozatait lásd az 1. táblázatban): szaruhártya-perforálódás vagy jelentős mértékű szaruhártya-fekélyesedés, ezen belül staphyloma (a szaruhártya rendellenes kidomborodása); vér jelenléte a szem elülső szemzugában; negyedfokú szaruhártya-homály; a fényreflex 72 órán át tartó hiánya (másodfokú szivárványhártya-válaszreakció); a kötőhártya fekélyesedése; a kötőhártyában vagy a pislogóhártyában jelentkező szövetelhalás; vagy leválás. Erre azért van szükség, mert az ilyen léziók általában nem visszafordíthatók. Javasolt továbbá, hogy a vizsgálatoknak a tervezett 21 napos megfigyelési időszak vége előtti befejezéséhez az alábbi szemléziókat használják kíméletes végpontokként. Ezek a léziók súlyosan irritáló vagy korróziós hatású sérülések, valamint olyan sérülések előrejelzésének minősülnek, amelyek várhatóan nem fordulnak vissza teljesen a 21 napos megfigyelési időszak végéig: a sérülés súlyos mélysége (pl. a stroma felületi rétegein túlra kiterjedő szaruhártya-fekélyesedés), a szaruhártyaszél 50 %-osnál nagyobb mértékű rongálódása (ahogyan azt az alsó szemhéj szöveteinek elfehéredése bizonyítja), valamint súlyos szemfertőzés (gennyes váladék). A következők kombinációja: a szaruhártya felületének vaszkularizációja (azaz pannus); a fluoreszceinnel megfestett terület a naponta végzett értékelés alapján az idő múlásával nem csökken; és/vagy a vizsgálati vegyi anyag alkalmazása után öt nappal elmarad az újrahámosodás, szintén a vizsgálat korai befejezésére vonatkozó klinikai döntést potenciálisan befolyásoló, hasznos kritériumnak minősül. E megállapítások azonban önmagukban nem elegendőek a vizsgálat korai befejezésére vonatkozó döntés indokolásához. A szemre gyakorolt súlyos hatások meghatározását követően laboratóriumi állatokat kezelő állatorvossal vagy ilyen állatokra szakosodott állatorvossal, illetve a klinikai léziók azonosítására képesítéssel rendelkező személyzettel kell konzultálni annak meghatározására szolgáló klinikai vizsgálat érdekében, hogy e hatások kombinációja indokolja-e a vizsgálat korai befejezését. A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása után 1, 24, 48 és 72 óra elteltével meg kell mérni és rögzíteni kell a szemreakciókat (kötőhártya-, szaruhártya- és szivárványhártya-reakciók) (1. táblázat). A szemléziókat nem mutató állatokat legkorábban a becseppentés után 3 nappal lehet elpusztítani. A nem súlyos szemléziókat mutató állatokat legalább addig megfigyelés alatt kell tartani, amíg a léziók meg nem szűnnek, vagy legfeljebb 21 napig, amikor a vizsgálat befejeződik. A léziók állapotának és visszafordíthatóságának vagy visszafordíthatatlanságának meghatározása érdekében legalább az 1., a 24. a 48., a 72. órában, a 7., a 14. és a 21. napon kell megfigyelést végezni, és azt dokumentálni kell. Gyakrabban kell megfigyeléseket végezni, ha az szükséges annak meghatározásához, hogy a kísérleti állaton humánus megfontolásból eutanáziát kell-e végrehajtani, vagy negatív eredmények miatt el kell-e azokat távolítani a vizsgálatból.

A szemléziók mértékét (1. táblázat) minden egyes vizsgálatkor fel kell jegyezni. A szem bármely egyéb lézióját (pl. pannus, elszíneződés, elülső szemzug elváltozásai) vagy a káros szisztémás hatásokat szintén dokumentálni kell.

A reakciók vizsgálatát megkönnyítheti egy binokuláris kézi nagyító, egy kézi réslámpa, egy biomikroszkóp vagy bármely más megfelelő eszköz alkalmazása. A 24 óra után tett megfigyelések rögzítését követően a szemek még fluoreszcein segítségével is megvizsgálhatók.

A szemreakciók értékelése elkerülhetetlenül szubjektív. A szemreakciók értékelésének harmonizálása és a vizsgáló laboratóriumok, illetve a megfigyelésekben és azok értékelésében részt vevők segítése érdekében a megfigyeléseket végző személyzetet megfelelően ki kell képezni az alkalmazott értékelési rendszer használatára.

▼M7

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények értékelése

A szemirritációs pontszámokat a léziók jellegével és súlyosságával, illetve visszafordíthatóságukkal vagy visszafordíthatatlanságukkal összefüggésben kell meghatározni. Az egyes pontszámok nem jelentenek abszolút normát a vegyi anyagok irritációs tulajdonságai tekintetében, mivel a vizsgálati vegyi anyag egyéb hatásai is értékelés tárgyát képezik. Az egyes pontszámokat ehelyett referenciaértékeknek kell tekinteni, amelyeknek csak akkor van jelentőségük, ha az összes megfigyelés ismertetése és értékelése alátámasztja ezeket.

Vizsgálati jegyzőkönyv

A Vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Az in vivo vizsgálatok indokolása: a korábban rendelkezésre álló vizsgálati adatok, ezen belül a lépcsőzetes vizsgálati stratégia során nyert adatok bizonyító erejének elemzése:

— a korábbi vizsgálatokból rendelkezésre álló, vonatkozó adatok ismertetése;

— a vizsgálati stratégia egyes szakaszaiban nyert adatok;

— az elvégzett *in vitro* vizsgálatok, ezen belül az eljárások, illetve a vizsgálati/referenciaanyagokkal kapott eredmények részleteinek ismertetése;

— az elvégzett *in vivo* bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálatok és a kapott eredmények ismertetése;

— az adatok bizonyító erejének elemzése az *in vivo* vizsgálat elvégzéséhez.

Vizsgálati vegyi anyag:

— azonosító adatok (pl. kémiai név, és a CAS-szám, amennyiben rendelkezésre áll; tisztaság; ismert szennyeződések; forrás; tételszám);

— fizikai megjelenés és fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. pH, illékonyság, oldhatóság, stabilitás, vízzel való reakcióképesség);

— keverék esetén azonosítandók a komponensek, többek között közlendők az azokat alkotó anyagok azonosító adatai (pl. kémiai név és a CAS-szám, amennyiben rendelkezésre áll) és a koncentrációjuk;

— az alkalmazott dózisok.

Vivőanyag:

— név, (adott esetben) koncentráció, alkalmazott térfogat;

— a vivőanyag megválasztásának indoklása.

Kísérleti állatok:

— az alkalmazott faj/törzs, adott esetben az albínó nyúltól eltérő faj alkalmazásának indoklása;

— az egyes állatok életkora a vizsgálat kezdetén;

— az állatok száma ivaronként a vizsgálati és kontrollcsoportokban (ha szükséges);

— az egyes állatok testtömege a vizsgálat előtt és végén;

— származás, tartási körülmények, takarmány stb.

▼M7

Érzéstelenítők és fájdalomcsillapítók

— a helyi érzéstelenítők és a szisztémás hatású fájdalomcsillapítók beadásának dózisai és időpontjai;

— helyi érzéstelenítő alkalmazása esetén a szer neve, tisztasága, típusa, valamint a vizsgálati vegyi anyaggal való esetleges kölcsönhatása.

Eredmények:

— az irritáció értékelésére az egyes megfigyelési időpontokban alkalmazott módszer (pl. kézi réslámpa, biomikroszkóp, fluoreszcein) ismertetése;

— az irritációs/korróziós válaszreakció-adatok táblázatos megjelenítése mindegyik állatra vonatkozóan mindegyik megfigyelési időpontban egészen az állatoknak a vizsgálatból való kivételéig;

— a megfigyelt irritáció vagy korrózió jellegének és mértékének leíró jellegű ismertetése,

— a szemben megfigyelt bármely egyéb lézió (pl. vaszkularizáció, pannusképződés, összetapadások, elszíneződés) ismertetése;

— a szemen kívül jelentkező káros lokális és szisztémás hatások ismertetése, a fájdalom és a szorongás klinikai tüneteinek rögzítése, digitális fényképek, valamint adott esetben a kórszövettani eredmények ismertetése.

Az eredmények tárgyalása

Az eredmények kiértékelése

A laboratóriumi állatokon végzett szemirritációs vizsgálatok eredményeinek emberre extrapolálása csak korlátozott érvényességű. Az albínó nyúl sok esetben érzékenyebb a szemirritáló vagy -korróziós anyagokra, mint az ember.

Ügyelni kell arra, hogy az adatok kiértékelése során kizárják a másodlagos fertőzés eredményeként jelentkező irritációt.

SZAKIRODALOM

(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) E melléklet B.4., *Akut bőrirritáció/bőrkorrózió* című fejezete.

▼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) E melléklet B.40., *In vitro bőrkorrózió: transzkután elektromos rezisztencia vizsgálat (TER)* című fejezete.

(14) E melléklet B.40A., *In vitro bőrkorrózió: emberi bőrmodellen végzett vizsgálat* című fejezete.

(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) E melléklet B.47., *Szarvasmarha*-szaruhártya *opacitásának és permeabilitásának mérésén alapuló vizsgálati módszer i.* a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok és ii. a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására című fejezete.

(17) E melléklet B.48., Izolált csirkeszem vizsgálatán alapuló vizsgálati módszer i. a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok és ii. a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására című fejezete.

(18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3rd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.

(19) UN (2011), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications.

(20) EK (2008), Az Európai Parlament és a Tanács 2008. december 16-i 1272/2008/EK rendelete az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról. (HL L 353., 2008.12.31., 1. o.)

(21) ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

1. táblázat

A szemléziók osztályozása

Szaruhártya	Fokozat
Homályosság: a homályosság mértéke (az érték megállapításához a legsűrűbb területet kell venni) (*)	
Nem észlelhető fekélyesedés vagy homályosság	0
Szórványos vagy diffúz homályos területek (a megszokott csillogás enyhe tompulásán kívül), a szivárványhártya részletei tisztán láthatók	1
Könnyen kivehető áttetsző terület; a szivárványhártya részletei kissé elhomályosodottak	2
Gyöngyházfényű terület; a szivárványhártya semmilyen részlete nem látható; a pupilla mérete alig észlelhető	3
Nem átlátszó szaruhártya; a szivárványhártya egyáltalán nem látható	4
Lehetséges maximum: 4	
Szivárványhártya	
Normális	0
Észrevehetően mélyebb redők, vérbőség, duzzanat, mérsékelt vérbőség a szaruhártya körül; vagy belövelltség; a szivárványhártya fényre reagál (a lassú reakció is pozitív)	1
Vérzés, nagymérvű roncsolódás, vagy nem reagál a fényre	2
Lehetséges maximum: 2	
Kötőhártya	
Vörösödés (a szemhéjak és a szemgolyó kötőhártyájára vonatkozik; kivéve a szaruhártyát és a szivárványhártyát)	
Normális	0
Egyes vérerek vérteltek (belövelltek)	1
Diffúz, bíborvörös szín; az egyes vérerek nehezen kivehetők	2
Diffúz erőteljes vörös	3
Lehetséges maximum: 3	
Kötőhártya-vizenyő (chemosis)	
Duzzanat (a szemhéjak és/vagy a pislogóhártyák esetében)	
Normális	0
A normálisnál kissé duzzadtabb	1
Nyilvánvaló duzzanat, a szemhéjak részleges kifordulásával	2
Duzzanat, nagyjából félig zárt szemhéjakkal	3
Duzzanat, és a szemhéjak több mint félig zárva vannak	4
Lehetséges maximum: 4	

(*) A szaruhártya homályos területének nagyságát fel kell jegyezni

▼M7

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Sav-/alkálitartalék: savas készítmények esetében a nátrium-hidroxid meghatározott pH kialakításához szükséges, a készítmény 100 grammjára vetített (grammban kifejezett) mennyisége. Lúgos készítmények esetében a nátrium-hidroxid meghatározott pH kialakításához szükséges, a készítmény 100 grammjára vetített, grammban kifejezett kénsav mennyiségével egyenértékű (grammban kifejezett) mennyisége (Young *et al.* 1988).

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Szemirritációt nem okozó anyag: a szemirritációt okozó anyagok EPA szerinti I., II. vagy III., a GHS szerinti 1., 2., 2A. vagy 2B., illetve az EU szerinti 1. vagy 2. kategóriájába nem tartozó anyag (17) (18) (19).

Szemkorróziót okozó anyag: a) a szemben visszafordíthatatlan szövetkárosodást okozó anyag; b) a GHS szerinti 1., az EPA szerinti I., illetve az EU szerinti 1. kategóriába besorolt, szemirritációt okozó vegyi anyag (17) (18) (19).

Szemirritációt okozó anyag: a) olyan vegyi anyag, amely visszafordítható elváltozást okoz a szemben; b) az EPA szerinti II. vagy III., a GHS szerinti 2., 2A. vagy 2B, illetve az EU szerinti 2. kategóriába besorolt, szemirritációt okozó vegyi anyag (17) (18) (19).

Súlyos szemirritációt okozó anyag: a) olyan vegyi anyag, amely 21 napon belül meg nem szűnő szövetkárosodást vagy a fizikai látóképesség súlyos romlását okozza; b) a GHS szerinti 1., az EPA szerinti I. vagy az EU szerinti 1. kategóriába besorolt, szemirritációt okozó anyag (17) (18) (19).

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Lépcsőzetes megközelítés: olyan lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amelynek keretében a vizsgálati vegyi anyagra vonatkozó valamennyi információt meghatározott sorrendben áttekintik, és az egyes szinteken az adatok bizonyító erejének elemzésével meghatározzák, hogy a következő szintre való továbblépés előtt a veszélyességi osztályozásra vonatkozó döntéshez elegendő információ áll-e rendelkezésre. Ha a vizsgálati vegyi anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján megállapítható, további vizsgálatra nincs szükség. Ha a vizsgálati vegyi anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján nem állapítható meg, több lépcsőben egymás után állatkísérleteket kell végezni mindaddig, amíg az egyértelmű besorolás meg nem állapítható.

Az adatok bizonyító erejének mérlegelése (mérlegelési folyamata): Az egyes adatok alapján nem feltétlenül nyilvánvaló következtetést megalapozó, az összegyűjtött információkra vonatkozó érvek és ellenérvek alkalmazása.

▼M7

A B.5. VIZSGÁLATI MÓDSZER KIEGÉSZÍTÉSE ([1])

LÉPCSŐZETES VIZSGÁLATI STRATÉGIA SZEMIRRITÁCIÓ ÉS SZEMKORRÓZIÓS HATÁS VIZSGÁLATÁHOZ

Általános megfontolások

A tudományos ésszerűség és az állatok kímélete érdekében fontos, hogy elkerülhető legyen az állatokkal való szükségtelen kísérletezés, illetve minimálisra lehessen csökkenteni azoknak a vizsgálatoknak a számát, amelyek valószínűleg súlyos válaszreakciókat váltanak ki a kísérleti állatokban. Az *in vivo* vizsgálatok fontolóra vétele előtt minden, a vegyi anyag potenciális szemirritáló/szemkorróziós hatásával összefüggő információt ki kell értékelni. Előfordulhat, hogy már elegendő bizonyíték létezik a vizsgálati vegyi anyag szemirritációs vagy szemkorróziós potenciál szempontjából történő besorolására anélkül, hogy laboratóriumi állatokon kísérleteket kellene végezni. Az adatok bizonyító erejének elemzésével és a lépcsőzetes vizsgálati stratégia alkalmazásával tehát minimálisra csökkenthető az *in vivo* vizsgálatok szükségszerűsége, különösen, ha a vegyi anyag valószínűsíthetően súlyos reakciókat okoz.

A vegyi anyagok szemirritáló és szemkorróziós hatásával kapcsolatban rendelkezésre álló információk értékelésre javasolt elvégezni az adatok bizonyító erejének elemzését annak meghatározása érdekében, hogy az *in vivo* szemvizsgálatokon kívül szükség van-e egyéb vizsgálatokra az irritáló/korróziós potenciál jellemzéséhez. Ha további vizsgálatokra van szükség, a vonatkozó kísérleti adatok összegyűjtéséhez a lépcsőzetes vizsgálati stratégiát javasolt alkalmazni. Az olyan anyagok esetében, amelyeket korábban nem vizsgáltak, az anyag szemkorróziós/szemirritációs potenciáljának értékeléséhez szükséges adatsor előállításához a lépcsőzetes vizsgálati stratégiát kell alkalmazni. Az e kiegészítésben ismertetett kiindulási vizsgálati stratégiát egy OECD-munkaértekezleten (1) dolgozták ki, majd később a vegyi anyagok humán egészségügyi és környezeti hatásainak osztályozására szolgáló harmonizált integrált veszélyosztályozási rendszer keretében 1998 novemberében a Vegyi Anyag Bizottság és a Vegyi Anyag Munkacsoport 28. együttes ülésén jóváhagyták és kibővítették (2), és azt 2011-ben egy OECD-szakértői csoport naprakésszé tette.

Bár ez a vizsgálati stratégia nem képezi a B5. vizsgálati módszer szerves részét, kifejezésre juttatja a szemirritációs/szemkorróziós tulajdonságok meghatározására ajánlott megközelítést. Ez a megközelítés jelenti a bevált gyakorlatot, és etikai szempontból is irányadó az *in vivo* szemirritációs/szemkorróziós vizsgálatokhoz. A vizsgálati módszer útmutatást ad az *in vivo* vizsgálatok elvégzéséhez, és összefoglalja azokat a tényezőket, amelyekre az ilyen vizsgálatok mérlegelése előtt ki kell térni. A lépcsőzetes vizsgálati stratégia az adatok bizonyító erején alapuló megközelítést biztosít a vegyi anyagok szemirritációs/szemkorróziós tulajdonságaival kapcsolatos meglévő adatok értékeléséhez, valamint lépcsőzetes megközelítést biztosít azon vegyi anyagok vonatkozó adatainak összegyűjtéséhez, amelyekhez további vizsgálatokra van szükség, vagy amelyeket korábban egyáltalán nem vizsgáltak. A stratégia magában foglalja továbbá, hogy először validált és elfogadott *in vitro* vagy *ex vivo* vizsgálatokat kell végezni, majd meghatározott körülmények mellett a B.4. vizsgálati módszerrel további vizsgálatokat (3) (4) kell lefolytatni.

A lépcsőzetes vizsgalati stratégia ismertetése

A vizsgálatoknak a lépcsőzetes vizsgálati stratégia (ábra) keretében történő elvégzése előtt minden rendelkezésre álló információt ki kell értékelni annak meghatározása érdekében, hogy szükség van-e *in vivo* szemvizsgálatokra. Bár egy-egy paraméter (pl. szélsőséges pH-érték) vizsgálatából is jelentős mennyiségű információ nyerhető ki, az összes rendelkezésre álló információt figyelembe kell

([1]) A szemirritációnak a REACH szerinti átfogó vizsgálati stratégiájának alkalmazását lásd még az ECHA Útmutató az információs követelményekhez és a kémiai biztonsági értékeléshez című dokumentumának R.7a. fejezetében: Végpontokra vonatkozó útmutató: http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

venni. A kérdéses vegyi anyag vagy szerkezeti analógjai hatásaival kapcsolatos összes vonatkozó adatot értékelni kell az adatok bizonyító erejéről való döntés meghozatalakor, és meg is kell indokolni ezt a döntést. Elsődleges hangsúlyt kell fektetni a vegyi anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló humán és állatkísérletek adataira, ezt követően az *in vitro* vagy *ex vivo* vizsgálatok eredményére. Lehetőség szerint kerülni kell korróziós hatású vegyi anyagok *in vivo* vizsgálatát. A vizsgálati stratégia során figyelembe veendő tényezők többek között a következők:

Validált és nemzetközileg elfogadott módszerekből nyert, humán és/vagy állatokra vonatkozó és/vagy in vitro adatok (1. lépés).

Először is a rendelkezésre álló humán adatokat, pl. klinikai vagy munkaegészségügyi vizsgálatokat, valamint esettanulmányokat és/vagy állatokon végzett szemvizsgálatok adatait és/vagy a szemirritációra/szemkorrózióra vonatkozó, validált és nemzetközileg elfogadott módszerekből nyert, *in vitro* adatokat kell kiértékelni, mivel ezek a szemre gyakorolt hatásokkal közvetlenül összefüggő információkat szolgáltatnak. Ezt követően a rendelkezésre álló bőrkorróziós/bőrirritációs humán és/vagy állatkísérletek adatait és/vagy a bőrkorrózióra vonatkozó, validált és nemzetközileg elfogadott módszerek alapján rendelkezésre álló adatokat kell kiértékelni. Az ismerten szemkorróziós hatású vagy súlyosan szemirritáló vegyi anyagokat nem szabad állatok szemébe cseppenteni, ahogyan a bőrkorróziós és a súlyosan bőrirritáló hatású vegyi anyagokat sem; az ilyen vegyi anyagokat úgy kell tekinteni, hogy egyúttal szemkorróziós és/vagy szemirritáló hatásúak is. Nem szabad *in vivo* szemvizsgálatokat végezni olyan vegyi anyagokkal sem, amelyek esetében korábbi szemvizsgálatok alapján elegendő bizonyíték van az ilyen hatások hiányára.

A szerkezet-aktivitási összefüggések (SAR) elemzése (2. lépés).

Meg kell fontolni szerkezetileg rokon anyagok vizsgálatának eredményeit, ha rendelkezésre állnak ilyen eredmények. Ha a szerkezetileg rokon anyagokkal vagy keverékeikkel kapcsolatban elegendő olyan humán és/vagy állatkísérleti adat áll rendelkezésre, amely valószínűsíti a szemkorróziós/szemirritációs potenciált, feltételezhető, hogy a vizsgálati vegyi anyag ugyanilyen válaszreakciókat vált ki. Ilyen esetekben a vegyi anyagot nem feltétlenül kell megvizsgálni. A lépcsőzetes vizsgálati stratégia értelmében a szerkezetileg rokon anyagok vagy keverékeik vizsgálatából származó negatív adatok nem jelentenek elegendő bizonyítékot arra, hogy a vegyi anyag nem korróziós hatású vagy nem irritáló. A bőrre és a szemre gyakorolt hatások vonatkozásában is validált és elfogadott SAR-megközelítéseket kell alkalmazni a korróziós és irritáló potenciál meghatározására.

Fizikai-kémiai tulajdonságok és kémiai reakcióképesség (3. lépés).

A szélsőséges pH-értékű, például $\leq$2,0 vagy $\geq$11,5 kémhatású vegyi anyagok erőteljes lokális hatást gyakorolhatnak. Ha a szélsőséges pH-érték az alapja annak, hogy egy vegyi anyagot szemkorróziós vagy szemirritáló hatásúnak minősítsenek, akkor figyelembe lehet venni az anyag sav-/alkálitartalékát (pufferkapacitását) is (5)(6)(7). Ha a pufferkapacitás alapján valószínűsíthető, hogy a vegyi anyag nem lehet szemkorróziós hatású (azaz szélsőséges pH-értékű és alacsony sav-/alkálitartalékkal rendelkező vegyi anyag), akkor ennek megerősítésére további vizsgálatokat kell végezni, lehetőleg validált és elfogadott *in vitro* vagy *ex vivo* vizsgálatok alkalmazásával (lásd a 10. pontot).

Más meglévő információk fontolóra vétele (4. lépés)

Ebben a fázisban a dermális alkalmazás esetén jelentkező szisztémás toxicitással kapcsolatban rendelkezésre álló összes információt ki kell értékelni. A vizsgálati vegyi anyag akut dermális toxicitását is fontolóra kell venni. Ha kimutatható, hogy a vizsgálati vegyi anyag dermális alkalmazás esetén erősen mérgező, előfordulhat, hogy nem kell a szemben megvizsgálni. Bár nem feltétlenül van összefüggés az akut dermális toxicitás és a szemirritáció/szemkorrózió között, fel kell

▼M7

tételezni, hogy ha egy szer dermálisan alkalmazva erősen mérgező, a szembe cseppentve is erősen mérgező lesz. Az ilyen adatokat a 2. és a 3. lépés között is figyelembe lehet venni.

A vegyi anyag bőrkorróziós hatásának értékelése, ha ezt szabályozási célból is előírják (5. lépés).

Először a bőrkorróziós és a súlyos irritációs potenciált kell értékelni a B.4. vizsgálati módszernek (4) és az azt kísérő kiegészítésnek (8) megfelelően, melynek során ki kell térni többek között a validált és nemzetközileg elfogadott *in vitro* bőrkorróziós vizsgálati módszerek alkalmazására (9) (10) (11). Ha kimutatható, hogy a vegyi anyag bőrkorróziót vagy súlyos bőrirritációt okoz, szemkorróziós vagy súlyosan szemirritáló hatású vegyi anyagnak is tekinthető. Ezért további vizsgálatra nem lenne szükség. Ha a vegyi anyag nem bőrkorróziós vagy nem súlyosan bőrirritáló hatású, *in vitro* vagy *ex vivo* szemvizsgálatot kell végezni.

In vitro vagy *ex vivo* vizsgálatok eredményei (6. lépés).

Nem kell állatokon kísérletezni olyan vegyi anyagokkal, amelyek validált és kimondottan a szem vagy a bőr korróziójának/irritációjának értékelésére nemzetközileg elfogadott módszerekkel végzett *in vitro* vagy *ex vivo* vizsgálatokban (12) (13) korróziós vagy súlyos irritáló hatást mutattak. Feltételezhető, hogy az ilyen vegyi anyagok *in vivo* is hasonlóan súlyos hatásokat váltanak ki. Ha nem állnak rendelkezésre validált és elfogadott *in vitro*/*ex vivo* vizsgálatok, át kell ugrani a 6. lépést és közvetlenül a 7. lépésre kell áttérni.

Nyulakon végzett *in vivo* vizsgálat (7. és 8. lépés).

Az *in vivo* szemvizsgálatokat egyetlen állatot alkalmazó kiindulási vizsgálattal kell kezdeni. Ha ennek eredményei szerint a vegyi anyag súlyosan szemirritáló vagy szemkorróziós hatású, nem szabad további vizsgálatokat végezni. Ha a kiindulási vizsgálat nem mutat ki semmilyen korróziós vagy súlyosan irritáló hatást, két további állat alkalmazásával megerősítő vizsgálatot kell végezni. A megerősítő vizsgálat eredményeitől függően további vizsgálatokra lehet szükség. [lásd a B.5. vizsgálati módszert]

▼M7

VONATKOZÓ VIZSGÁLATI ÉS KIÉRTÉKELÉSI STRATÉGIA SZEMIRRITÁCIÓ, ILLETVE SZEMKORRÓZIÓS HATÁS VIZSGÁLATÁHOZ

	Tevékenység	Eredmény	Következtetés
1	Szemre gyakorolt hatásokat kimutató, rendelkezésre álló humán és/vagy állatkísérleti adatok és/vagy validált és nemzetközileg elfogadott módszerek *in vitro* adatai	Súlyos szemkárosodás	Apikális végpont; szemkorróziós hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség vizsgálatokra.
		Szemirritáló hatású	Apikális végpont; szemirritáló hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség vizsgálatokra.
		Nem szemkorróziós, illetve nem szemirritáló hatású	Apikális végpont; nem szemkorróziós és nem szemirritáló hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség vizsgálatokra.
	Bőrkorróziós hatásokat kimutató, rendelkezésre álló humán és/vagy állatkísérleti adatok és/vagy validált és nemzetközileg elfogadott módszerek *in vitro* adatai	Bőrkorróziós hatású	Szemkorróziós hatást kell feltételezni. Nincs szükség vizsgálatokra.
	Súlyos bőrirritáló hatásokat kimutató, rendelkezésre álló humán és/vagy állatkísérleti adatok és/vagy validált és nemzetközileg elfogadott módszerek *in vitro* adatai	Súlyosan bőrirritáló	Szemirritáló hatást kell feltételezni. Nincs szükség vizsgálatokra.
	↓		
	nem áll rendelkezésre információ, illetve a rendelkezésre álló információk nem meggyőzőek		
	↓		
2	SAR-értékelést kell végezni a szemkorrózióra / szemirritációra vonatkozóan	Súlyos szemkárosodást jelez előre	Szemkorróziós hatást kell feltételezni. Nincs szükség vizsgálatokra.
		Szemirritációt jelez előre	Szemirritáló hatást kell feltételezni. Nincs szükség vizsgálatokra.
	SAR-értékelést kell mérlegelni a bőrkorrózióra vonatkozóan	Bőrkorróziót jelez előre	Szemkorróziós hatást kell feltételezni. Nincs szükség vizsgálatokra.
	↓		
	Nem lehet előrejelzést tenni, vagy az előrejelzések nem meggyőzőek vagy negatívak		
	↓		
3	Meg kell mérni a pH-t (adott esetben figyelembe kell venni a pufferkapacitást is)	pH ≤ 2 vagy ≥ 11,5 (nagy pufferkapacitással, amennyiben lényeges)	Szemkorróziós hatást kell feltételezni. Nincs szükség vizsgálatokra.
	↓		
	2 < pH < 11,5, vagy pH ≤ 2,0 vagy pH ≥ 11,5 alacsony vagy nulla pufferkapacitással, amennyiben lényeges		
	↓		
4	Figyelembe kell venni a dermális alkalmazás esetén fellépő szisztémás toxicitásra vonatkozó adatokat	Erősen mérgező olyan koncentrációknál, amelyeket a szemben vizsgálnának.	A vegyi anyag túlzottan mérgező ahhoz, hogy vizsgálni lehessen. Nincs szükség vizsgálatokra.

▼M7

	Tevékenység	Eredmény	Következtetés
	↓		
	Nem áll rendelkezésre ilyen információ, vagy a vegyi anyag nem erősen mérgező		
	↓		
5	A bőrkorróziós potenciál e melléklet B.4. fejezetében található vizsgálati stratégiának megfelelően, kísérleti úton történő értékelése, ha szabályozási célra is szükséges	Korróziós hatás vagy súlyos irritációs hatás	Szemkorróziós hatásúnak kell feltételezni. Nincs szükség további vizsgálatokra.
	↓		
	A vegyi anyag nem bőrkorróziós hatású vagy nem súlyosan bőrirritáló		
	↓		
6	Validált *in vitro* vagy *ex vivo* szemkorróziós vizsgálato(k) elvégzése	Korróziós hatás vagy súlyos irritációs válasz	Szemkorróziós hatásúnak vagy súlyosan szemirritálónak kell feltételezni, amennyiben az elvégzett vizsgálat alkalmazható a korróziós hatású, illetve súlyosan irritáló vegyi anyagok azonosítására, és amennyiben a vegyi anyag a vizsgálat alkalmazási körébe tartozik. Nincs szükség további vizsgálatokra.
		Irritációs hatás	Szemirritálónak kell feltételezni, amennyiben az elvégzett vizsgálat(ok) alkalmazható(k) a korróziós hatású, a súlyosan irritáló és az irritáló vegyi anyagok megfelelő azonosítására, és amennyiben a vegyi anyag a vizsgálat(ok) alkalmazási körébe tartozik. Nincs szükség további vizsgálatokra.
		Nincs irritációs hatás	Nem szemirritálónak kell feltételezni, amennyiben az elvégzett vizsgálat(ok) alkalmazható(k) a nem irritáló vegyi anyagok megfelelő azonosítására, e vegyi anyagoknak a szemirritáló, súlyosan szemirritáló vagy szemkorróziós hatású vegyi anyagoktól való megfelelő megkülönböztetésére, és amennyiben a vegyi anyag a vizsgálat(ok) alkalmazási körébe tartozik. Nincs szükség további vizsgálatokra.
	↓		
	A validált és elfogadott in vitro vagy ex vivo szemvizsgálat(ok) nem alkalmazható(k) következtetés levonására		
	↓		

▼M7

	Tevékenység	Eredmény	Következtetés
7	Egyetlen nyúlon el kell végezni a kiindulási *in vivo* szemvizsgálatot.	Súlyos szemkárosodás	Szemkorróziós hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség további vizsgálatokra.
	↓		
	Nincs súlyos károsodás vagy nincs válaszreakció		
	↓		
8	Egy vagy két további állaton el kell végezni a megerősítő vizsgálatot.	Korróziós vagy irritáló hatású	Szemkorróziós vagy szemirritáló hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség további vizsgálatokra.
		Nem korróziós vagy irritáló hatású	Nem szemkorróziós és nem szemirritáló hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség további vizsgálatokra.

SZAKIRODALOM

(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) E melléklet B.4., Akut bőrirritáció/bőrkorrózió című fejezete.

(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) E melléklet B.4. fejezetének kiegészítése: Lépcsőzetes vizsgálati stratégia bőrirritációhoz és bőrkorrózióhoz

(9) E melléklet B.40., *In vitro* bőrkorrózió: transzkután elektromos rezisztencia vizsgálat *(TER)* című fejezete.

(10) E melléklet B.40a., *In vitro* bőrkorrózió: Emberi bőrmodellen végzett vizsgálat című fejezete.

(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) E melléklet B.47., Szarvasmarha-szaruhártya opacitásának és permeabilitásának mérésén alapuló vizsgálati módszer i. a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok és ii. a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására című fejezete.

(13) E melléklet B.48., Izolált csirkeszem vizsgálatán alapuló vizsgálati módszer i. a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok és ii. a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására című fejezete.

▼B

B.6. **A BŐR ÉRZÉKENNYÉ TÉTELE**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Megjegyzések:

Az érzékenységnek, illetve a vizsgálatok azon képességének, hogy felderítik az emberek bőrét potenciálisan érzékennyé tevő anyagokat, nagy jelentősége van a toxicitás közegészségügyi osztályozási rendszerében.

Nincs olyan vizsgálati eljárás, amely a potenciálisan az emberi bőrt érzékennyé tevő összes anyagot megfelelően kimutatja, illetve amely az összes anyag tekintetében megfelelően alkalmazható.

Az anyag fizikai tulajdonságait, beleértve a bőrön való áthatolás képességét és egyéb tényezőket is, meg kell fontolni egy vizsgálat kiválasztása során.

Kétféle vizsgálatot dolgoztak ki tengerimalacokhoz: az egyik a hatásjavító típusú vizsgálat, amelyikben az allergiás állapot esetleges előidézése FCA-ban (Freunds Complete Adjuvant) való feloldás vagy szuszpendálás segítségével történik; a másik a nem hatásjavító típusú vizsgálat.

A hatásjavító típusú vizsgálatok valószínűleg pontosabbak egyes anyagok emberek bőrén érzékenységet előidéző hatásának előrejelzésére, mint azok a módszerek, amelyek nem alkalmazzák az FCA-t, ezért ezek a módszerek előnyben részesülnek.

A tengerimalac legerősebb ingerlési vizsgálata (Guinea-Pig Maximisation Test, GMPT) széles körben alkalmazott hatásjavító típusú vizsgálat. Bár számos másik módszer is alkalmazható egy anyag lehetséges, a bőrt érzékennyé tevő hatásának megállapítására, a GPMT a leginkább javasolt hatásjavító típusú módszer.

Sok vegyianyagosztály esetében a nem hatásjavító vizsgálatok (amelyek közül a leginkább javasolt a Bühler-vizsgálat) az általános vélemény szerint kevésbé érzékenyek.

Egyes esetekben megfelelő indokok állnak fenn a külsőleg történő adagolással végzett Bühler-vizsgálat választásához, a bőrbe befecskendezéses GPMT vizsgálat alkalmazása helyett. A Bühler-vizsgálat alkalmazását tudományosan indokolni kell.

Az alábbi módszer ismerteti a GPMT és a Bühler-vizsgálatot. Más módszerek is alkalmazhatók, ha alkalmazásuk jóváhagyott és tudományosan alátámasztottak.

Amennyiben egy elismert szűrővizsgálat pozitív eredményt ad, a vizsgált anyagot potencionális érzékenyítőként kell megjelölni. További vizsgálatot tengerimalacokkal nem szükséges végezni. Azonban, ha negatív eredményt ad a szűrő vizsgálat, akkor az itt leírt eljárásnak megfelelően kell a vizsgálatot a tengerimalacokkal elvégezni.

Lásd továbbá a B. rész Általános bevezetését.

▼B

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Bőr érzékennyé tétele: (allergén kontakt dermatitis) a vizsgált anyagra adott, az immunrendszer által irányított bőrválasz. Embereknél a válasz jellemző tünetei: viszketés, bőrpirosság, ödéma, kiütés, hólyag, vagy ezen jelenségek valamilyen kombinációja. Más fajoknál a reakciók különbözhetnek, és esetleg csak bőrpirosság és ödéma jelentkezik.

Indukciós expozíció: kísérleti eljárás, amikor a kísérlet alanyát kiteszik egy vizsgált anyag hatásának, azzal a céllal, hogy túlérzékeny állapotot idézzenek elő.

Indukciós fázis: legalább egyhetes időtartam az indukciós expozíciót követően, ami alatt a túlérzékeny állapot kialakulhat.

Kiváltó expozíció: kísérleti expozíció, amikor az előzetesen kezelt kísérleti állatot kiteszik a vizsgált anyag hatásának az indukciós időszak után azzal a céllal, hogy meghatározzák túlérzékeny módon reagál-e.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

A kísérleti eljárás érzékenységét és megbízhatóságát felmérik minden hat hónapban, olyan anyagok felhasználásával, amelyeknek ismerten gyenge, vagy közepes bőrérzékenyítő hatásuk van.

Helyesen lefolytatott vizsgálat esetén, hatásjavító vizsgálatban legalább 30 százalékban, nem hatásjavító vizsgálat esetén legalább 15 százalékban jelentkeznie kell a gyenge/közepes válasznak.

A következő anyagok alkalmazása javasolt:

CAS-szám	EINECS-szám	EINECS megnevezés	Közismert név
101-86-0	202-983-3	alfa-Hexilfahéjaldehid	α-hexil-cinnamaldehid
149-30-4	205-736-8	benzotiazol-2-tiol (2-Merkapto-benztiazol)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzokain	nordkain

Meghatározott körülmények között megfelelő indoklással olyan más ellenőrző anyagokat is fel lehet használni, amelyek megfelelnek a fenti követelményeknek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ALAPELVE

A kísérleti állatokat először alávetik a vizsgált anyag hatásának intradermális befecskendezés és/vagy epidermális adagolás útján (indukciós expozíció). Egy 10–14 napos pihentetési időszak után (indukciós fázis), amely alatt az immunválasz kifejlődhet, a kísérleti állatok megkapják a kiváltó dózist. A kísérleti állatoknak a kiváltó expozícióra adott reakciójának kiterjedtségét és mértékét összehasonlítják a kontrollcsoport tagjainak reakciójával, amelyeket látszólagos indukciónak vetettek alá, és amelyek megkapták a kiváltó expozíciót.

1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZEREK LEÍRÁSA

Ha a vizsgált anyag eltávolítása szükségesnek tűnik, akkor azt víz, vagy valamilyen megfelelő oldószer alkalmazásával hajtható végre, a létrejött reakció, vagy az epidermisz épségének befolyásolása nélkül.

▼B

1.5.1. *Tengerimalac legerősebb ingerlési vizsgálata (GPMT)*

1.5.1.1. Előkészületek

Az egészséges, fiatal felnőtt albinó tengerimalacokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napon át a laboratóriumi körülményekhez kell szoktatni. A vizsgálat előtt véletlenszerűen kiválasztják, és a kezelési csoportokba osztják az állatokat. A szőrzet eltávolítását nyírással, borotválással vagy esetleg kémiai szőrtelenítéssel végzik, az alkalmazott vizsgálati eljárástól függően. Gondosan el kell kerülni a bőr felhorzsolását. Az állatok tömegét megmérik a vizsgálat kezdete előtt és a befejezését követően.

1.5.1.2. Vizsgálati körülmények

1.5.1.2.1. Kísérleti állatok

Kísérleti célokra általánosan használt, laboratóriumban szaporított albinó tengerimalacokat alkalmaznak.

1.5.1.2.2. Az állatok száma és neme

Hím és nőstény egyedek egyaránt használhatók. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek.

Legalább 10 állatot kell alkalmazni a kezelt csoportban és 5-öt a kontrollcsoportban. Ha kevesebb, mint 20 tengerimalacot használtak a vizsgálati csoportban és kevesebb mint 10-et a kontrollcsoportban, és nem lehet azt a következtetést levonni, hogy a vizsgált anyag érzékenységet okoz, akkor a kísérleti állatok számát legalább 20-ra, a kontrollcsoportban lévő állatok számát legalább 10-re növelve, további kísérlet elvégzése célszerű.

1.5.1.2.3. Adagolási szintek

Az indukciós expozícióhoz felhasznált vizsgált anyag koncentrációja legyen megfelelően elviselhető és a lehető legmagasabb, ami még csak gyenge közepes bőrirritációt okoz. A kiváltó expozíciónál alkalmazott koncentráció a legmagasabb, még nem irritatív dózis legyen. Ha szükséges, akkor a megfelelő koncentrációk két vagy három állat alkalmazásával végzett elővizsgálattal meghatározhatók. Megfontolandó az FCA-val kezelt állatok e célra való felhasználása.

1.5.1.3. A kísérlet végrehajtása

1.5.1.3.1. Indukció

Kezelt csoport, 0-dik nap

Három pár injekció beadása intradermálisan, 0,1 ml térfogattal, a váll környékére, amelyet előzőleg megtisztítottak a szőrzettől, olyan módon, hogy minden párból egy a középvonal egyik, egy a másik oldalára esik.

Injekció 1.1:1 keverék (v/v) FCA/víz, vagy fiziológiás sóoldat.

Injekció 2. a vizsgált anyag, megfelelő vivőanyagban, a kiválasztott koncentrációban.

Injekció 3. a vizsgált anyag a kiválasztott koncentrációban, amelyet FCA/víz vagy, fiziológiás sóoldat 1:1 keverékében (v/v) készítenek el.

A harmadik injekciónál a vízben oldható anyagokat feloldják a vizes fázisban, mielőtt az FCA-val összekevernék. A vizes fázis hozzáadása előtt a zsírban oldódó, illetve az oldhatatlan anyagokat szuszpendálják FCA-ban. A vizsgált anyag végső koncentrációja megegyezik a 2. injekció során alkalmazottal.

▼B

A 1. és a 2. injekciót egymáshoz közel adják be a fejhez legközelebbre, míg a harmadikat a vizsgálati terület farok felé eső részén kell beadni.

Kontrollcsoport, 0-dik nap

Három pár injekció beadása 0,1 ml térfogattal, ugyanarra a helyre, mint a kezelés alatt álló állatoknál.

Injekció 1.1:1 keverék (v/v) FCA/víz, vagy fiziológiás sóoldat.

Injekció 2. hígítatlan vivőanyag.

Injekció 3. 50 % m/v vivőanyag-készítmény FCA/víz, vagy fiziológiás sóoldat 1:1 keverékében (v/v).

Kezelt és kontrollcsoport, 5–7. nap

Körülbelül 24 órával a helyi indukciós alkalmazás megkezdése előtt, ha az anyag nem irritatív hatású, a vizsgálati területet rövid szőrzetnyírás és/vagy borotválás után 0,5 ml 10 százalékos nátrium-lauril-szulfát vazelines elegyével kezelik, a helyi irritáció kiváltása érdekében.

Kezelt csoport, 6–8. nap

A vizsgálati felületet ismét megtisztítják a szőrzettől. Egy szűrőpapírt (2 × 4 cm) telítenek a vizsgált anyag alkalmas vivőanyaggal képzett oldatával, azt alkalmazzák a vizsgált felületen, és azzal szigetelő kötés alkalmazásával, 48 órán keresztül szoros érintkezésben tartják. A vivőanyag kiválasztását indokolni kell. Szilárd anyagokat finomra porítják, és a megfelelő vivőanyaggal elegyítik. A folyadékok adott esetben hígítás nélkül is alkalmazhatóak.

Kontrollcsoport, 6–8. nap

A vizsgálati felületet ismét megtisztítják a szőrzettől. A vivőanyagot önmagában viszik fel azonos eljárással a vizsgált felületre, és azzal szigetelő kötés alkalmazásával, 48 órán keresztül szoros érintkezésben tartják.

1.5.1.3.2. Kiváltás

Kezelt és kontrollcsoport, 20–22. nap

A hasszéleket megtisztítják a szőrzettől, mind a kezelt, mind a kontrollcsoport esetében. Egy tapaszt, vagy egy tokot helyeznek fel az állatok hasának egyik szélére, amelyet megtöltenek a vizsgált anyaggal, és ha lehetséges, akkor egy tokot vagy egy tapaszt alkalmaznak, helyeznek fel a másik hasszélen, amelyet megtöltenek a vivőanyaggal. A tapaszokat szigetelő kötés segítségével, 24 órán keresztül szoros érintkezésben tartják a bőrrel.

1.5.1.3.3. Megfigyelés és értékelés: kezelt és kontrollcsoport

— a tapasz eltávolítása után, hozzávetőleg 21 órával a felületet megtisztítják és rövidre nyírják és/vagy leborotválják, és szőrtelenítik, ha szükséges,

— nagyjából 3 órával később (hozzávetőleg 48 órával a kiváltó expozíció kezdete után) megfigyelik és feljegyzik a bőrreakciót a függelékben megadott fokozatoknak megfelelően,

— hozzávetőleg 24 órával ez után a megfigyelés után egy második megfigyelést is végeznek (72 órával a kísérlet kezdete után) és ezt is feljegyzik.

Javasolt a kezelt és a kontrollállatok vakpróbával történő megfigyelése.

Ha szükséges az első kiváltás eredményeinek pontosítása, akkor – szükség esetén – egy második kiváltás (azaz újbóli kiváltás) alkalmazása megfontolandó egy új kontrollcsoporton, hozzávetőleg egy héttel az első után. Újbóli kiváltást az eredeti kontrollcsoporton is végre lehet hajtani.

▼B

Minden bőrreakciót és minden észlelhető leletet, beleértve a szisztémás reakciókat, amelyek az indukció és a kiváltás hatására jönnek létre, megfigyelnek és feljegyeznek a Magnusson/Kligman-féle értékelési skála szerint (lásd: Függelék). Egyéb eljárások (pl. kórszövettani vizsgálatok, a bőrön található ráncok mélységének mérése) is elvégezhetők, a kétséges reakciók tisztázása érdekében.

1.5.2. *Bühler-vizsgálat*

1.5.2.1. Előkészületek

Az egészséges, fiatal felnőtt albinó tengerimalacokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napon át a laboratóriumi körülményekhez kell szoktatni. A vizsgálat előtt véletlenszerűen kiválasztják, és a kezelési csoportokba osztják az állatokat. A szőrzet eltávolítását nyírással, borotválással vagy esetleg kémiai szőrtelenítéssel végzik, az alkalmazott vizsgálati eljárástól függően. Gondosan el kell kerülni a bőr felhorzsolását. Az állatok tömegét megmérik a vizsgálat kezdete előtt és a befejezését követően.

1.5.2.2. Vizsgálati körülmények

1.5.2.2.1. Kísérleti állatok

Kísérleti célokra általánosan használt, laboratóriumban szaporított albinó tengerimalacokat alkalmaznak.

1.5.2.2.2. Az állatok száma és neme

Hím és nőstény egyedek egyaránt használhatók. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek.

Legalább 20 állatot kell alkalmazni a kezelt csoportban és 10-et a kontrollcsoportban.

1.5.2.2.3. Adagolási szintek

Az indukciós expozícióhoz felhasznált vizsgált anyag koncentrációja legyen a lehető legmagasabb, ami gyenge, ill. nem túl erős bőrirritációt okoz. A kiváltó expozíciónál alkalmazott koncentráció a legmagasabb, még nem irritatív dózis legyen. Ha szükséges, akkor a megfelelő koncentrációk két vagy három állat alkalmazásával végzett előzetes vizsgálattal meghatározhatók.

Vízoldékony vizsgálati anyagoknál célszerű vizet, vagy nem irritatív hatású felszínkezelő oldatot használni vivőanyagként. Más vizsgált anyagokhoz 80 % etanol/víz ajánlott az indukcióhoz, és aceton a kiváltáshoz.

1.5.2.3. A kísérlet végrehajtása

1.5.2.3.1. Indukció

Kezelt csoport, 0-dik nap

Az egyik hasszélt megtisztítják a szőrzettől (rövidre nyírják). Egy tapaszt helyeznek fel, amelyet teljesen telítenek a megfelelő vivőanyagban elegyített vizsgálati anyaggal (a vivőanyag kiválasztását indokolni kell, folyékony vizsgált anyagok felvihetők adott esetben hígítás nélkül is).

A vizsgálati tapaszt felhelyezik a vizsgálat felületre, és egy megfelelő szigetelő tapasszal, vagy tokkal, szigetelő kötés segítségével 6 órán keresztül érintkezésben tartják a kísérleti állat bőrével.

▼B

A vizsgálati tapasznak szigetelőnek kell lennie. Egy kerek vagy négyzet alakú vattakötés alkalmas, aminek legalább 4–6 cm^2 területűnek kell lennie. A zártság biztosítására megfelelő leszorító eszköz alkalmazása javasolt. Ha pólyát alkalmaznak, akkor bizonyos körülmények között további expozícióra lehet szükség.

Kontrollcsoport, 0-dik nap

Az egyik hasszélt megtisztítják a szőrzettől (rövidre nyírják). A vivőanyagot önmagában helyezik fel, azonos módon, mint ahogy az a kezelt csoportnál történik. A vizsgálati tapaszt felhelyezik a vizsgálat felületre, és egy megfelelő szigetelő tapasszal, vagy tokkal, szigetelő kötés segítségével 6 órán keresztül érintkezésben tartják a kísérleti állat bőrével.

Kezelt és kontrollcsoport, 6–8. és 13–15. nap

A 0-dik napon végzettel megegyező eljárást kell végrehajtani, ugyanazon a vizsgálati felületen (szőrnyírás, ha szükséges) ugyanazon a hasszélen a 6–8. napon és megismételve a 13–15. napon.

1.5.2.3.2. Kiváltás

Kezelt és kontrollcsoport, 27–29. nap

A kezeletlen hasszélt megtisztítják a szőrzettől (rövidre nyírják), mind a kezelt, mind a kontrollcsoport esetében. Egy szigetelőtapaszt vagy egy tokot helyeznek fel a kezelt és kontrollcsoportba tartozó állatok hátsó, kezeletlen hasszélére, amelyet megtöltenek a megfelelő mennyiségű, legnagyobb, de nem irratív koncentrációjú vizsgált anyaggal.

Adott esetben csak vivőanyaggal átitatott szigetelőtapaszt vagy -tokot helyeznek fel a kezelt és a kontrollcsoportba tartozó állatok elülső, kezeletlen hasszélére. A tapaszt vagy tokot megfelelő kötés segítségével, 6 órán keresztül szoros érintkezésben tartják a kísérleti állat bőrével.

1.5.2.3.3. Megfigyelés és értékelés

— a tapasz eltávolítása után hozzávetőleg 21 órával a felületet megtisztítják a szőrzettől,

— hozzávetőleg 3 órával később (körülbelül 30 órával a kiváltó tapasz alkalmazása után) a bőr reakcióját megfigyelik és feljegyzik a függelékben megadott fokozatoknak megfelelően,

— hozzávetőleg 24 órával ezen megfigyelés után (nagyjából 54 órával a kiváltó tapasz alkalmazása után) a bőr reakcióját ismét megfigyelik és feljegyzik.

Javasolt a kezelt és a kontrollállatok vakpróbával történő megfigyelése.

Ha szükséges az első kiváltás eredményeinek pontosítása, akkor – szükség esetén – egy második kiváltás (azaz újbóli kiváltás) alkalmazása megfontolandó egy új kontrollcsoporton, hozzávetőleg egy héttel az első után. Újbóli kiváltást az eredeti kontrollcsoporton is végre lehet hajtani.

▼B

Minden bőrreakciót és minden észlelhető leletet, beleértve a szisztémás reakciókat, amelyek az indukció és a kiváltás hatására jönnek létre, megfigyelnek és feljegyeznek a Magnusson/Kligman-féle értékelési skála szerint (lásd: Függelék). Egyéb eljárások (pl. kórszövettani vizsgálatok, a bőrön található ráncok mélységének mérése) is elvégezhetők a kétséges reakciók tisztázása érdekében.

2. **ADATOK (GPMT és Bühler vizsgálatok)**

Minden adatot táblázat formájában összesítenek, amely tartalmazza minden állat tekintetében az egyes megfigyelési időpontok alkalmával észlelt bőrreakciókat.

3. **ZÁRÓVIZSGÁLATI JELENTÉS (GPMT ÉS BÜHLER VIZSGÁLAT)**

Ha szűrő próbát végeznek a tengerimalac-vizsgálat előtt (pl. helyi nyirokcsomópróba [LLNA], egérfüldaganat-vizsgálat [MEST]), akkor vizsgálat leírását ill. az irodalmi hivatkozásokat, beleértve az eljárás részleteit is meg kell adni a kapott eredményekkel és a vizsgált és az összehasonlító anyaggal együtt.

Vizsgálati jelentés (GPMT és Bühler vizsgálatok)

A vizsgálati jelentésben – amennyiben lehetséges – az alábbi információknak kell szerepelniük:

Kísérleti állatok:

— az alkalmazott tengerimalactörzs,

— az állatok száma, életkora és neme,

— az állatok eredete, tartási körülmények, étrend stb.,

— az egyes állatok testsúlya a vizsgálat kezdetekor.

Vizsgálati körülmények:

— az állat azon testrészének előkészítése, ahová felhelyezik a vizsgált anyagot,

— a felhasznált tapasz típusának és a tapaszolási eljárásnak a részletes leírása,

— az előzetes vizsgálat eredménye, a vizsgálatban alkalmazandó indukciós és kiváltó koncentrációra vonatkozó következtetésekkel együtt,

— a vizsgált anyag előkészítésének, alkalmazásának és eltávolításának részletei,

— a vivőanyag kiválasztásának indoklása,

— a vivő és a vizsgált anyag koncentrációja az indukciós és a kiváltó eljárásban, és a két eljárás során összesen felhasznált vizsgált anyag mennyisége.

Eredmények:

— a legutolsó, a vizsgálat érzékenységét és megbízhatóságát ellenőrző eljárás (ld. 1.3.) eredményeinek összefoglalása, beleértve az ehhez felhasznált anyagokra, koncentrációkra és vivőanyagra vonatkozó információkat is,

▼B

— az egyes állatok megfigyelésének eredményei, beleértve az értékelő rendszerre vonatkozó adatokat,

— a megfigyelt hatások jellegének és fokozatának részletes leírása,

— bármely kórszövettani megfigyelés.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

4. **HIVATKOZÁSOK**

Ez a módszer megfelel az OECD TG 406-nak.

▼B

Függelék

TÁBLÁZAT:

Magnusson/Kligman-féle értékelési skála a kiváltó tapaszos vizsgálatra adott reakciók értelmezéséhez

0 = nincs látható változás

1 = enyhe, vagy foltos börpirosság

2 = mérsékelt és összefüggő bőr pirosság

3 = élénk bőrpirosság és duzzanat”

▼M4

B.7. ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ, 28 NAPOS ORÁLIS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKON

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 407. vizsgálati iránymutatásában (2008) leírt módszerrel. Az eredeti 407. vizsgálati iránymutatást 1981-ben fogadták el. 1995-ben felülvizsgált változatot fogadtak el, amellyel további információk nyerhetők a vizsgált állatokról, különösen neurotoxicitási és immuntoxicitási szempontból.

2. 1998-ban az OECD a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint az endokrin rendszert esetlegesen károsító anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó új vizsgálati iránymutatások kidolgozására irányuló, kiemelt fontosságú tevékenységet indított (8). A tevékenység részeként az „ismételt adagolású, 28 napos orális toxicitási vizsgálat rágcsálókon” elnevezésű eljárásra vonatkozó (407. számú) OECD-iránymutatást a vizsgált vegyi anyagok endokrin aktivitásának észlelésére alkalmas paraméterekkel frissítették. Az eljárást átfogó nemzetközi program keretében vizsgálták, hogy megállapítsák az új paraméterek relevanciáját és gyakorlati alkalmazhatóságát, a paraméterek (anti)ösztrogén, (anti)androgén és (anti)tiroid hatású vegyi anyagok tekintetében nyújtott teljesítményét, a laboratóriumon belüli és laboratóriumközi ismételhetőséget, valamint azt, hogy az új paraméterek mennyiben akadályozzák a 407. vizsgálati iránymutatást megelőzően előírt paraméterek alkalmazását. Az így kapott nagy mennyiségű adatot egy átfogó OECD-jelentésben (9) foglalták össze és értékelték részletesen. Ez a frissített (a 407. vizsgálati iránymutatással egyenértékű) B.7. vizsgálati módszer a nemzetközi vizsgálati program tapasztalatain és eredményein alapul. A jelen vizsgálati módszer lehetővé teszi bizonyos, az endokrin rendszer útján kifejtett hatások egyéb toxikológiai hatások összefüggésében történő értékelését.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

3. Egy vegyi anyag toxikus jellemzőinek értékelése és felmérése során az ismételt adagolású orális toxicitást azután lehet meghatározni, hogy az akut toxicitási vizsgálatok kezdeti eredményei már rendelkezésre állnak. A jelen vizsgálati módszer célja a hatásoknak a lehetséges toxicitási célok igén széles körénél történő vizsgálata. A módszer információkkal szolgál a viszonylag rövid időn belüli ismételt expozíció valószínű egészségügyi kockázatairól, beleértve az idegrendszerre, az immunrendszerre és az endokrin rendszerre gyakorolt hatásokat. E meghatározott végpontok tekintetében rendszerint azonosítja azokat a neurotoxikus potenciállal rendelkező vegyi anyagokat, amelyek e tekintetben további, részletes vizsgálatokat indokolhatnak, valamint a pajzsmirigyet fiziológiai szempontból befolyásoló vegyi anyagokat. Adatokkal szolgálhat emellett a fiatal ivarérett állatok hím és/vagy nőstény szaporítószerveire hatást gyakorló vegyi anyagokról, továbbá jelezheti azok immunológiai hatásait.

4. A jelen B.7. vizsgálati módszerrel kapott eredmények a veszélyek azonosítására és kockázatértékelésre használandók. Az endokrin rendszerrel kapcsolatos paraméterek alkalmazásával kapott eredményeket az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére vonatkozó elvi keretrendszerének összefüggésében kell értelmezni (11). A módszer egy alapvető, ismételt adagolású toxicitási vizsgálatot foglal magában, amely a 90 napos vizsgálatot nem igénylő vegyi anyagok esetén (például abban az esetben, ha az előállított mennyiség nem halad meg bizonyos határértékeket), vagy egy hosszú távú vizsgálat előzetes vizsgálataként alkalmazható. Az expozíció időtartama 28 nap.

▼M4

5. A vizsgált vegyi anyag endokrin aktivitásának esetleges észlelésére alkalmas paraméterek validálása érdekében folytatott nemzetközi program során kimutatták, hogy a jelen B.7. vizsgálati módszerrel kapott adatok minősége jelentős mértékben függ a vizsgálati laboratórium tapasztalatától. Ez konkrétan a nőstény szaporítószervek ciklikus változásainak kórszövettani meghatározásához, valamint a kisméretű, nehezen boncolható hormonfüggő szervek súlyának meghatározásához kapcsolódik. A kórszövettani vizsgálathoz iránymutatást dolgoztak ki (19). Az iránymutatás elérhető az OECD vizsgálati iránymutatásokkal foglalkozó nyilvános weboldalán. Célja, hogy segítse a kórboncnokok vizsgálatait, valamint fokozza a vizsgálat érzékenységét. Több paraméterről találták úgy, hogy alkalmas az endokrin rendszerrel kapcsolatos toxicitás kimutatására, és ezeket belefoglalták a vizsgálati módszerbe. Azokat a paramétereket, amelyekről nem állt rendelkezésre elegendő adat azok hasznosságának igazolására, vagy amelyek endokrin rendszert károsító anyagok kimutatásának elősegítésére való képességéről a validációs program során csekély bizonyítékot találtak, a módszer opcionális végpontként javasolja (lásd a 2. függeléket).

6. A validációs folyamat során előállított adatok alapján hangsúlyozandó, hogy e vizsgálat nem kellően érzékeny valamennyi (anti)androgén és (anti)ösztrogén hatásmechanizmusú anyag azonosítására (9). A jelen vizsgálati módszer nem alkalmazandó az endokrin rendszert károsító hatásokra leginkább érzékeny életszakaszban. A vizsgálati módszerrel a validációs folyamat során ennek ellenére azonosítottak a pajzsmirigy működésére gyenge és erős hatást gyakorló anyagokat, valamint erős és mérsékelt, ösztrogén vagy androgén receptorokon keresztül ható endokrin hatóanyagokat, ugyanakkor a legtöbb esetben nem sikerült azzal azonosítani az ösztrogén vagy androgén receptorokra gyenge hatást gyakorló endokrin hatóanyagokat. Éppen ezért a vizsgálat nem nevezhető az endokrin aktivitás szűrésére szolgáló vizsgálatnak.

7. Következésképpen az e hatásmechanizmusokkal összefüggő hatások hiánya nem tekinthető az endokrin rendszerre gyakorolt hatások hiánya bizonyítékának. Az endokrin rendszer által közvetített hatások tekintetében az anyag jellemzését éppen ezért nem szabad kizárólag az e vizsgálati módszerrel kapott eredményekre alapozni, hanem azokat az adatok bizonyító erejének súlyozásához kell felhasználni, a lehetséges endokrin aktivitás jellemzéséhez figyelembe véve a vegyi anyagról rendelkezésre álló összes adatot. Éppen ezért az endokrin aktivitásra (az anyag jellemzésére) vonatkozó szabályozói döntéshozatalnak átfogó alapokon kell nyugodnia, és nem alapulhat kizárólag az e vizsgálati módszer alkalmazásával kapott eredményeken.

8. Elismerik, hogy minden, állatkísérleteken alapuló eljárást az állatgondozásra vonatkozó helyi szabványoknak megfelelően kell végrehajtani; az alábbiakban foglalt, gondozásra és kezelésre vonatkozó leírások minimális teljesítményszabványok, amelyeket a szigorúbb helyi szabályozások felülbírálnak. Az állatokkal való humánus bánásmódról további iránymutatás a megfelelő OECD-kiadványban található (14).

9. Az alkalmazott fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

10. A vizsgált vegyi anyagot naponta, szájon át adjuk be több kísérleti állatcsoportnak, csoportonként más-más adagolási szinten, 28 napon keresztül. Az anyag beadásának időszakában az állatokat a toxicitás jeleinek észlelése érdekében minden nap gondosan megfigyeljük. A vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított állatokat felboncoljuk, továbbá a vizsgálat befejezése után az életben maradt állatokat is elpusztítjuk és felboncoljuk. A 28 napos vizsgálat információkkal szolgál az ismételt orális expozíció hatásairól, és jelezheti a további, hosszú távú vizsgálatok szükségességét. Információkat biztosíthat továbbá a hosszabb távú vizsgálatokhoz használandó koncentrációk

▼M4

kiválasztásához. A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával kapott adatok lehetővé teszik a vizsgált vegyi anyag toxicitásának jellemzését, a dózis-válasz összefüggés kimutatását, valamint a még nem észlelhető káros hatásszint (NOAEL) meghatározását.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

11. A javasolt rágcsálófaj a patkány, bár más rágcsálófajok is alkalmazhatók. Ha a jelen B.7. vizsgálati módszerben meghatározott paramétereket más rágcsálófajon vizsgáljuk, a döntést részletesen indokolni kell. Bár biológiailag elképzelhető, hogy más fajok a patkányhoz hasonlóan reagálnak a toxikus anyagokra, a kisebb méretű fajok alkalmazása nagyobb variabilitáshoz vezethet a kisebb szervek boncolásával összefüggő technikai nehézségek miatt. A nemzetközi validációs programban a patkány volt az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatására használt egyetlen faj. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal, ivarérett állatokat kell alkalmazni. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. Az adagolást az elválasztás után a lehető legrövidebb időn belül célszerű elkezdeni, de mindenképpen az állatok 9 hetes kora előtt. A vizsgálat megkezdésekor az egyes kísérleti állatok testsúlyának csak minimális mértékben szabad különböznie egymástól, és egyik nem esetében sem térhet el ± 20 %-nál nagyobb mértékben a nem átlagától. Amennyiben az ismételt orális adagolást egy hosszabb távú vizsgálat előzetes vizsgálataként végezzük, lehetőség szerint azonos törzsből való, azonos eredetű állatokat kell alkalmazni mindkét vizsgálathoz.

Az állatok tartása és etetése

12. Minden eljárásnak meg kell felelnie a laboratóriumi állatgondozásra vonatkozó helyi szabványoknak. A kísérleti állatok tartására használt helyiség hőmérséklete 22 °C (± 3 °C) kell, hogy legyen. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem szabad meghaladnia a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez hagyományos laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgált vegyi anyaggal való megfelelő keveredés igénye is befolyásolhatja, ha a vizsgált vegyi anyagot a takarmánnyal adjuk be. Az állatokat nemek szerint elkülönítve, kis csoportokban kell tartani; tudományos szempontból indokolt esetekben az állatok egyenként is elhelyezhetők. Ketrecben való csoportos elhelyezés esetén egy ketrecben legfeljebb öt állat tartható.

13. Rendszeresen ellenőrizni kell, hogy a takarmány nem tartalmaz-e szennyező anyagokat. A takarmányból egy mintát a jegyzőkönyv véglegesítéséig meg kell őrizni.

Az állatok előkészítése

14. Egészséges, fiatal, ivarérett állatokat osztunk véletlenszerűen a kontroll- és kezelt csoportokba. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezésének lehetséges hatásait. Az állatokat az egyedi azonosíthatóság céljából megjelöljük, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig a ketrecükben tartjuk a laboratóriumi körülményekhez való szoktatás céljából.

A dózisok előkészítése

15. A vizsgált vegyi anyagot gyomorszondán át, vagy az állatok táplálékába vagy ivóvizébe keverve adjuk be. A szájon át történő beadás módszerét a vizsgálat céljától, valamint a vizsgált vegyi anyag fizikai, kémiai és toxikokinetikai tulajdonságaitól függően választjuk meg.

▼M4

16. A vizsgált vegyi anyagot szükség esetén feloldjuk vagy szuszpendáljuk alkalmas vivőanyagban. Lehetőség szerint elsősorban vizes oldatot/emulziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (például kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot. Amennyiben nem víz a vivőanyag, a vivőanyag toxikus tulajdonságainak ismertnek kell lenniük. Meg kell határozni azt is, hogy a vizsgált vegyi anyag mennyire stabil az adott vivőanyagban.

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

17. Minden egyes adagolási szinthez legalább 10 állatot (5 hímet és 5 nőstényt) kell alkalmazni. Ha időközi elpusztítást tervezünk, a létszámot annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el szándékozunk pusztítani. Meg kell fontolni egy további, tíz állatból (nemenként öt példányból) álló kísérő csoport alkalmazását a kontrollcsoportban és a legnagyobb adaggal kezelt csoportban, amelyen a kezelés időszakát követően legalább 14 napig megfigyeljük a toxikus hatás visszafordíthatóságát, tartósságát vagy késleltetett kialakulását.

Adagolás

18. Általában legalább három vizsgálati és egy kontrollcsoport alkalmazandó, azonban ha más adatok értékelése alapján 1 000 mg/testsúlykilogramm/nap adag esetén nem várható hatás, határérték-vizsgálat végezhető. Ha nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok, az alkalmazandó dózisok meghatározása céljából tartománybehatároló vizsgálat végezhető (azonos törzsből való, azonos eredetű állatokon). A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgált vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Ha a vizsgált vegyi anyag beadásához vivőanyagot alkalmazunk, a kontrollcsoportnak a vivőanyagból a felhasznált legnagyobb mennyiséget kell kapnia.

19. Az adagolási szintek kiválasztásánál figyelembe kell venni a vizsgált, vagy azzal rokon vegyi anyagok toxicitására és (toxiko)kinetikájára vonatkozóan rendelkezésre álló adatokat. A legmagasabb dózist úgy kell kiválasztani, hogy az toxikus tüneteket keltsen, de ne okozzon halált vagy súlyos szenvedést a kísérleti állatoknak. Ezután az adagokat fokozatosan csökkentjük, azzal a céllal, hogy a legalacsonyabb adagolási szinten kimutassuk az dózistól függő hatásokat és a nem észlelhető káros hatásszintet (NOAEL). A csökkenő dózisszintek beállításához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása, a dózisok közötti nagyon nagy intervallumok (például 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazásával szemben pedig gyakran előnyben részesítendő egy negyedik vizsgálati csoport beiktatása.

20. Ha általános toxicitást (például testsúlycsökkenést, a májra, a szívre, a tüdőre vagy a vesére kifejtett hatásokat stb.) vagy egyéb, nem feltétlenült toxikus reakcióra utaló változásokat (például csökkent táplálékfogyasztást, májmegnagyobbodást) figyelünk meg, az immun-, ideg- és endokrin rendszer szempontjából érzékeny végpontok tekintetében megfigyelt hatások értelmezésekor óvatosan kell eljárni.

Határérték-vizsgálat

21. Ha a vizsgálat során egyetlen, legalább 1 000 mg/testsúlykilogramm/nap adagolási szint, vagy a takarmányban vagy ivóvízben beadott anyagmennyiség ennek megfelelő (a testsúly alapján végzett számításokon alapuló) százaléka, és az e vizsgálathoz leírt eljárás betartása mellett a vizsgált anyag nem okoz észlelhető toxikus hatásokat, valamint ha a szerkezetileg rokon vegyi anyagokra vonatkozó adatok alapján nem is várható a toxicitás bekövetkezése, akkor a teljes, három adagolási szintet átfogó tanulmány elvégzése nem feltétlenül tekintendő szükségesnek. A határérték-vizsgálat alkalmazandó, kivéve, ha az emberi expozíció ennél nagyobb adagolási szint használatát indokolja.

▼M4

A dózisok beadása

22. Az állatoknak 28 napon keresztül naponta, a hét 7 napján adjuk be a vizsgált vegyi anyagot. Ha a vizsgált vegyi anyagot szondán át adagoljuk, lehetőleg egyetlen adagban kell gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át beadni. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. E mennyiség nem haladhatja meg az 1 ml/100 testsúlygramm arányt, kivéve vizes oldatok esetében, amelyeknél 2 ml/100 testsúlygramm is alkalmazható. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy maró vegyi anyagok kivételével a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy a mennyiség valamennyi adagolási szinten konstans legyen.

23. A takarmánnyal vagy ivóvízzel adagolt vegyi anyagok esetében fontos biztosítani, hogy a vizsgált vegyi anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt vagy a vízháztartás egyensúlyát. Ha a vizsgált vegyi anyagot a takarmánnyal juttatjuk be, akkor vagy állandó takarmánykoncentráció (ppm), vagy az állatok testsúlyára kiszámított állandó dózisszint alkalmazható, és meg kell jelölni, hogy melyik alternatívát alkalmazzuk. A szondával bejuttatott vegyi anyagok esetében a dózist mindig a nap hasonló időszakában kell beadni, és szükség szerint ki kell igazítani ahhoz, hogy az állat testsúlyához viszonyítva állandó értéken lehessen tartani. Ha az ismételt adagolású vizsgálatot egy hosszú távú vizsgálat előtanulmányaként végezzük, mindkét vizsgálatban hasonló takarmányt kell alkalmazni.

Megfigyelések

24. A megfigyelési időszak 28 nap. A kísérő csoportban lévő állatokat, amelyekkel további megfigyeléseket tervezünk, még legalább további 14 napig kell kezelés nélkül tartani, hogy a toxikus hatások késleltetett előfordulását, megmaradását vagy visszafordíthatóságát megfigyeljük.

25. Naponta legalább egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban általános klinikai megfigyelést kell végezni, figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Fel kell jegyezni a kísérleti állatok klinikai kórállapotát. Naponta legalább kétszer meg kell vizsgálni az összes állatot megbetegedés és elhullás szempontjából.

26. Az első expozíció előtt egyszer (az egyedek közötti összehasonlítás érdekében), azt követően pedig legalább hetente egyszer az összes állatot részletes klinikai vizsgálatoknak kell alávetni. E megfigyeléseket az állatok tartására egyébként használt ketreceken kívül, lehetőleg egy szabványos karámban, minden alkalommal a nap hasonló időszakában kell elvégezni. A megfigyeléseket gondosan fel kell jegyezni, lehetőleg a vizsgálatokat végző laboratórium által kifejezetten meghatározott pontozásos rendszer segítségével. Törekedni kell arra, hogy minimálisak legyenek a kísérleti körülmények közötti eltérések, és hogy a megfigyeléseket lehetőleg olyan megfigyelők végezzék, akik nem tudnak a kezelésről. A feljegyzett észleléseknek ki kell terjedniük többek között a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapota, a váladékok és kiválasztott anyagok előfordulása, valamint az autonóm aktivitás (például könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupillaméret, szokatlan légzési ritmusok) tekintetében megfigyelhető változásokra. A járás, a testtartás és a kézbevételre adott reakció megváltozását, valamint a klónusos vagy tónusos görcsök, sztereotip viselkedés (például túlzott mosdás, megkergülés) vagy bármilyen bizarr viselkedésmód (például öncsonkítás, hátrafelé járás) megfigyelt eseteit is fel kell jegyezni (2).

27. Az expozíció negyedik hetében a különböző típusú ingerekre (2) (például hallószervi, vizuális és önérzékelési ingerekre) (3) (4) (5) mutatott reakciókat vizsgáljuk, felmérjük a szorítás erejét (6) és a motoros aktivitást (7). A követendő eljárásokkal kapcsolatban további részletek a vonatkozó szakirodalomban találhatók. Ettől függetlenül a hivatkozottaktól eltérő alternatív eljárások is alkalmazhatók.

▼M4

28. Az expozíció negyedik hetében mellőzhetők a funkcionális megfigyelések, ha a vizsgálatot egy azt követő (90 napos) szubkrónikus toxicitási vizsgálat előzetes vizsgálataként végezzük. Ebben az esetben a funkcionális megfigyeléseket az utóbbi vizsgálat részeként kell elvégezni. Másrészt az ismételt adagolású vizsgálat során végzett funkcionális megfigyelések adatainak megléte segítheti az azt követő szubkrónikus toxicitási vizsgálat során a dózisok kiválasztását.

29. Kivételes esetekben a funkcionális megfigyelések elhagyhatók azon csoportoknál is, amelyek egyébként olyan mértékű toxicitási tüneteket mutatnak, hogy az jelentős mértékben megzavarná a funkcionális vizsgálat eredményeit.

30. A boncolásnál minden nőstény ivari ciklusa meghatározható hüvelykenet alapján (nem kötelező). E megfigyelések információkkal szolgálnak az ivari ciklus elpusztítás időpontjában fennálló stádiumáról, és segíthetik az ösztrogénre érzékeny szövetek szövettani értékelését (lásd a szövettanra vonatkozó iránymutatást (19)).

Testsúly és táplálék-/vízfogyasztás

31. Minden állat súlyát hetente legalább egyszer le kell mérni. A felvett táplálék mennyiségét heti rendszerességgel le kell mérni. Amennyiben a vizsgált vegyi anyagot az ivóvízzel adjuk be, a vízfogyasztást is legalább hetente le kell mérni.

Hematológia

32. A vizsgálati időszak végén a következő hematológiai vizsgálatokat kell elvégezni: hematokrit, hemoglobinkoncentráció, vörösvértestszám, retikulociták, teljes és differenciált vérkép, trombocitaszám és a véralvadási idő/képesség mérése. Ha a vizsgált vegyi anyagról vagy annak vélt metabolitjairól ismert vagy feltételezhető, hogy oxidáló tulajdonságokkal rendelkeznek, az említett vizsgálatokon kívül többek között a methemoglobinkoncentrációt és a Heinz-testek előfordulását is meg kell határozni.

33. A vérmintákat egy megnevezett helyről kell venni, közvetlenül az állatok elpusztítása előtt vagy aközben, és azokat megfelelő körülmények között kell tárolni. Az állatokat az elpusztítás előtti éjszaka koplaltatni kell ([1]).

Klinikai biokémiai vizsgálatok

34. A klinikai biokémiai értékeknek a szövetekben jelentkező fontosabb toxikus hatások és különösen a vesére és a májra gyakorolt hatások vizsgálata érdekében végzett meghatározását a közvetlenül az állatok elpusztítása előtt vagy annak részeként elvégzett vérvétel során valamennyi állattól vett mintákon kell elvégezni (eltekintve az elhullásközeli állapotban lévő és/vagy időközben elpusztított egyedektől). A vérplazma- és vérszérum-meghatározások során vizsgálandó anyagok közé tartozik a nátrium, a kálium, a vércukor, az összkoleszterin, a karbamid, a kreatinin, az összprotein és az albumin, továbbá legalább két, májsejti hatásokat jelző enzim (például alanin-aminotranszferáz, aszpartát-aminotranszferáz, alkáli foszfatáz, γ-glutamil-transzpeptidáz és glutamát-dehidrogenáz), valamint az epesavak. Bizonyos körülmények között hasznos információk nyerhetők további (májból vagy máshonnan származó) enzimek, valamint a bilirubin méréséből.

35. Kiegészítésként a vizsgálat utolsó hetében a vizeletet előre meghatározott időpontokban való gyűjtése mellett a vizelet alábbi tulajdonságainak meghatározása is elvégezhető: megjelenés, mennyiség, ozmolalitás vagy fajsúly, pH-érték, fehérjék, glukóz és vér/vérsejtek.

([1]) Bizonyos szérum- és a plazmavizsgálatok, főleg a glükóz meghatározása esetén ajánlatos a vizsgálat előtti éjszaka koplaltatni az állatokat. Ennek fő indoka az, hogy a vizsgálatokat megelőző koplaltatás mellőzése szükségszerűen növelné a kapott eredmények variabilitását, ami így megnehezítené a kevésbé jellegzetes hatások felismerését és értelmezését. Másrészről az éjszakai koplaltatás befolyásolhatja az állatok általános anyagcseréjét, valamint – különösen azon vizsgálatok esetében, amelyeknél a vizsgált anyagot a táplálékkal adagolják – megzavarhatja a vizsgált vegyi anyagnak való napi expozíciót. Ha az éjszakai koplaltatás mellett döntünk, a klinikai biokémiai paramétereket a vizsgálat negyedik hetében, a funkcionális megfigyeléseket követően kell meghatározni.

▼M4

36. Ezeken túlmenően megfontolandó az általános szöveti roncsolódás plazma- vagy szérummarkereinek vizsgálata. Más vizsgálatokat is el kell végezni, ha a vizsgált vegyi anyag ismert tulajdonságai hatással vannak vagy lehetnek a kapcsolódó anyagcsere-folyamatokra; ilyen például a kalcium, a foszfát, a trigliceridek, egyes hormonok, valamint a kolinészteráz mérése. Ezeket az értékeket az egyes besorolási osztályokhoz tartozó vegyi anyagokra nézve vagy eseti alapon kell meghatározni.

37. Bár az endokrin rendszerrel kapcsolatos végpontok nemzetközi értékelése során nem nyert egyértelmű bizonyítást, hogy ez a pajzsmirigyhormonok (T3, T4) és a pajzsmirigyserkentő hormon (TSH) meghatározása tekintetében előnyös, hasznos lehet plazma- vagy szérummintákat megőrizni a T3, a T4 és a TSH (nem kötelező) mérése érdekében, amennyiben az agyalapi mirigy-pajzsmirigy tengelyre kifejtett hatásra utaló jeleket tapasztalunk. E minták tárolás céljából -20 °C hőmérsékletre fagyaszthatók. A hormonok meghatározásának variabilitását és az azzal kapott abszolút koncentrációt az alábbi tényezők befolyásolhatják:

— az elpusztítás időpontja, tekintettel a hormonkoncentrációk nap folyamán tapasztalható ingadozására,

— az állatot érő indokolatlan stressz elkerülése érdekében alkalmazott elpusztítási mód, amely hatással lehet a hormonkoncentrációkra,

— a hormonmeghatározásokhoz alkalmazott, standard görbéjük tekintetében esetlegesen eltérő vizsgálati készletek.

A pajzsmirigyre ható vegyi anyagok egyértelmű azonosítása kórszövettani vizsgálat útján hatékonyabban elvégezhető, mint hormonszintek alapján.

38. A kifejezetten hormon-meghatározási célra szánt plazmamintákat a nap hasonló időpontjában kell gyűjteni. Javasolt megfontolni a T3, T4 és TSH pajzsmirigyi kórszövettani elváltozások esetén végzett meghatározását. A kereskedelmi fogalomban kapható különböző vizsgálati készletek eltérő számszerű értékeket adnak a hormonkoncentrációk elemzése során. Következésképpen nem feltétlenül lehet teljesítménykritériumokat megadni egységes múltbeli adatok alapján. Másik lehetőségként a laboratóriumoknak törekedniük kell arra, hogy a T3 és a T4 variációs együtthatója 25 alatt, a TSH-é pedig 35 alatt maradjon. Minden koncentrációt ng/ml-ben kell feljegyezni.

39. Ha a rendelkezésre álló kiinduló adatok nem bizonyulnak elegendőnek, megfontolandó a hematológiai és klinikai biokémiai változók meghatározása az adagolás kezdete előtt, lehetőség szerint az állatok egy, a kísérleti csoportokba nem tartozó csoportjánál.

PATOLÓGIA

Autopszia

40. A vizsgálatokba bevont összes állatot teljes körű, beható autopsziának kell alávetni, ideértve a következők alapos vizsgálatát: a test külső felszíne, az összes testnyílás, a koponya, a mellüreg, a hasüreg és ezek tartalma. Az összes állat máját, veséit, mellékveséit, heréit, mellékheréit, prosztatáját és ondóhólyagját a koaguláló mirigyekkel együtt, csecsemőmirigyét, lépét, agyát és szívét (eltekintve az elhullásközeli és/vagy a vizsgálat befejeztét megelőzően elpusztított egyedekéitől) megfelelően megtisztítjuk minden rátapadt szövettől, és azok nedves súlyát a boncolást követően a lehető legrövidebb időn belül megmérjük, mielőtt azok kiszáradnának. A prosztata és a kapcsolódó szervek megtisztítása során ügyelni kell arra, hogy ne szúrjuk át a folyadékkal teli ondóhólyagokat. Másik lehetőségként az ondóhólyagok és a prosztata megtisztítása és megmérése a fixálást követően is elvégezhető.

▼M4

41. Ezenkívül nem kötelező jelleggel két további szövet is megmérhető a boncolást követő lehető legrövidebb időn belül, mielőtt kiszáradna: páros petefészkek (nedves súly), valamint méh, beleértve a méhnyakat (a méhszövet eltávolítása és súlymérésre való előkészítése tekintetében az OECD 440. vizsgálati iránymutatása (18) nyújt útmutatást).

42. A pajzsmirigy súlya (nem kötelező) a fixálást követően is meghatározható. A megtisztítás a szövetkárosodás elkerülése érdekében ez esetben is igen óvatosan, kizárólag a fixálást követően végzendő el. A szövetkárosodás veszélyeztetheti a kórszövettani elemzést.

43. Az alábbi testszöveteket mind a szövet típusa, mind pedig a szándékolt későbbi kórszövettani vizsgálatok (lásd a 47. fejezetet) szempontjából legmegfelelőbb fixálóközegben kell tartósítani: minden szövet, amelyen makroszkopikus elváltozás figyelhető meg, az agy (jellemző részek, például a nagyagy, a kisagy és a nyúltagyi híd), a gerincvelő, a szem, a gyomor, a vékony- és vastagbél (beleértve a Peyer-plakkot), a máj, a vesék, a mellékvesék, a lép, a szív, a csecsemőmirigy, a pajzsmirigy, a légcső és a tüdők (ezeket először megtöltjük fixálószerrel, és azután merítjük alá), az ivarmirigyek (herék és petefészkek), a járulékos nemi szervek (a méh és a méhnyak, a mellékherék, a prosztata és az ondóhólyagok a koaguláló mirigyekkel együtt), a hüvely, a húgyhólyag, a nyirokcsomók (a legközelebbi elvezető nyirokcsomón kívül egy további nyirokcsomót is ki kell venni a laboratórium tapasztalatainak megfelelően (15)), perifériás idegek (csípő vagy sípcsont környéki), lehetőleg az izomzathoz közeli helyről véve, harántcsíkolt izom, valamint csont csontvelővel (metszet vagy másik lehetőségként egy friss, csontvelőből felszívott minta formájában). A herék fixálását javasolt Bouin- vagy módosított Davidson-féle fixálószerbe merítéssel végezni (16) (17). A tunica albugineán a fixálószer gyors bejutása érdekében tűvel óvatosan sekély szúrást kell ejteni a szerv mindkét végén. A klinikai és más jellegű megfigyelések alapján további testszövetek vizsgálata is szükséges lehet. A fentieken túl meg kell őrizni minden olyan más szervet is, amely a vizsgált vegyi anyag ismert tulajdonságai alapján valószínűleg célszervnek tekinthető.

44. Az alábbi szövetek értékesek lehetnek az endokrin rendszerrel kapcsolatos hatások kimutatása szempontjából: Az ivarmirigyek (herék és petefészkek), a járulékos nemi szervek (a méh, beleértve a méhnyakat, a mellékherék, az ondóhólyagok a koaguláló mirigyekkel együtt, a dorsolateralis és a hasoldali prosztata), a hüvely, az agyalapi mirigy, a hím emlőmirigy, a pajzsmirigy és a mellékvese. A hím emlőmirigyek elváltozásairól nem áll rendelkezésre kellő dokumentáció, azonban ez a paraméter igen érzékeny lehet az ösztrogén hatású anyagokra. A 43. bekezdésben fel nem sorolt szervek, illetve szövetek megfigyelése nem kötelező (lásd a 2. függeléket).

45. A kórszövettani iránymutatás (19) további információkat tartalmaz az endokrin szövetek boncolásával, fixálásával, metszeteinek elkészítésével és kórszövettani vizsgálatával kapcsolatban.

46. A nemzetközi vizsgálati program szolgált némi bizonyítékkal arra, hogy a nemi hormonok homeosztázisára gyakorolt hatás tekintetében kismértékű potenciállal rendelkező vegyi anyagok endokrin rendszerre kifejtett, kevésbé szembetűnő hatásai az ivari ciklus különböző szövetekben végbemenő szinkronizálásának zavarai alapján ismerhetők fel, semmint a női ivarszervek nyilvánvaló kórszövettani elváltozásai alapján. Ugyan e hatásokra nem találtak egyértelmű bizonyítékot, a petefészkek (tüsző-, theca és granulosa sejtek), a méh, a méhnyak és a hüvely kórszövettani eredményeinek értelmezése során javasolt figyelembe venni az ivari ciklus esetleges aszinkronizmusának bizonyítékait. Ha értékeltük, a ciklus hüvelykenet alapján megállapított stádiuma is felhasználható ezen összehasonlítás során.

▼M4

Kórszövettani vizsgálatok

47. A tartósított szerveket és szöveteket mind a kontrollcsoportok, mind a magas dózissal kezelt csoportok összes egyede esetében teljes kórszövettani vizsgálatnak kell alávetni. Ha a magas dózissal kezelt csoport egyedei esetében a kezelésnek tulajdonítható elváltozások figyelhetők meg, e vizsgálatot az összes többi, különböző dózissal kezelt csoport egyedeire is ki kell terjeszteni.

48. Minden makroszkopikus elváltozást meg kell vizsgálni.

49. Kísérő csoport használata esetén azon szerveken és szöveteken kell kórszövettani vizsgálatot végezni, amelyeknél a kezelt csoportok egyedei esetében elváltozásokat lehetett kimutatni.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

50. Az adatokat minden egyes állattal kapcsolatban rögzíteni kell. Ezenfelül az összes adatot táblázat formájában összegezni kell, a vizsgált állatok minden csoportja tekintetében bemutatva, hogy hány egyeddel indult a vizsgálat, hány állat pusztult el, illetve hányat kellett elpusztítani humánus okokból a vizsgálat során, valamint az elpusztulás vagy elpusztítás időpontját; a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ideértve bármely toxikus hatás kezdetének idejét, időtartamát és súlyosságát, az elváltozásokat mutató állatok számát, az elváltozások típusát, súlyosságát és az egyes elváltozástípusokat mutató állatok százalékos arányát.

51. A számszerű eredményeket lehetőség szerint megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazásával kell kiértékelni. A hatás dózistartomány mentén történő összehasonlításaival kiküszöbölhető a több t-próba alkalmazása. A statisztikai módszereket a vizsgálat tervezésekor kell megválasztani.

52. A minőség-ellenőrzéshez javasolt múltbeli kontrolladatokat gyűjteni, a számszerű adatokhoz pedig kiszámítani a variációs együtthatót, különösen az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatásával összefüggő paraméterek tekintetében. Ezek az adatok felhasználhatók összehasonlítási célokra a tényleges vizsgálatok kiértékelése során.

Vizsgálati jegyzőkönyv

53. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— fizikai jelleg, tisztaság, fizikai és kémiai tulajdonságok,

— azonosító adatok.

Vivőanyag (ha van):

— a vivőanyag kiválasztásának indokolása, ha az nem víz.

Kísérleti állatok:

— használt faj/törzs,

— az állatok száma, kora és neme,

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.,

— az egyes állatok testsúlya a vizsgálat kezdetekor,

— patkánytól eltérő faj alkalmazásának indokolása.

Vizsgálati körülmények:

— az adagolási szintek kiválasztásának indokai,

— a vizsgált vegyi anyag formulázásával/a takarmány előkészítésével, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenitásával kapcsolatos adatok,

▼M4

— a vizsgált vegyi anyag beadására vonatkozó adatok,

— átszámítás a vizsgált vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/kg testsúly/nap), ha ez alkalmazható,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok.

Vizsgált opcionális végpontok

— a vizsgált opcionális végpontok felsorolása.

Eredmények:

— testsúly és annak változásai,

— táplálék- és vízfogyasztásra vonatkozó adatok, ha alkalmazható,

— toxikus reakcióra vonatkozó adatok nemek és adagolási szintek szerinti csoportosításban, beleértve a toxicitás jeleit,

— a klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (a változások visszafordíthatók-e vagy sem),

— az érzékszervi aktivitás, a szorítási erősség és a motoros aktivitás értékelése,

— hematológiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel,

— a klinikai biokémiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel,

— az állatok testsúlya az elpusztításkor és a szerveik súlya,

— boncolási eredmények,

— a kórszövettani vizsgálatok összes eredményének részletes ismertetése,

— abszorpciós adatok, ha rendelkezésre állnak,

— adott esetben az eredmények statisztikai feldolgozása.

Az eredmények tárgyalása.

Következtetések.

▼M4

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Androgenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében természetes androgén hormonokhoz (például a tesztoszteronhoz) hasonló hatást fejtsen ki.

Antiandrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes androgén hormonok (például a tesztoszteron) hatását gátolja.

Antiösztrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes ösztrogén hormonok (például a 17ß-ösztradiol) hatását gátolja.

Antitiroid hatás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes pajzsmirigyhormon (például a T_3) hatását gátolja.

Adagolás: általános fogalom, amely a dózist, valamint az adagolás gyakoriságát és időtartamát foglalja magában.

Dózis: a vizsgált vegyi anyag beadott mennyisége. A dózist a vizsgált vegyi anyag súlyának és a kísérleti állat egységnyi testsúlyának napi hányadosaként (például mg/testsúlykilogramm/nap), vagy a takarmányban lévő állandó koncentrációként fejezik ki.

Nyilvánvaló toxicitás: általános fogalom, amely a toxicitás vizsgált vegyi anyag beadását követően kialakuló egyértelmű tüneteire vonatkozik. E tüneteknek elegendőnek kell lenniük a veszély felméréséhez, továbbá olyan szintet kell képviselniük, amelynél a beadott dózis növelése várhatóan a toxicitás súlyos jeleinek kialakulásához és valószínű elhulláshoz vezet.

NOAEL: a „no-observed-adverse-effect level” (nem észlelhető káros hatásszint) rövidítése. Ez a legmagasabb dózisszint, amelynél még nem figyelhetők meg a kezelés okozta káros hatások.

Ösztrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes ösztrogén hormonokhoz (például a 17ß-ösztradiolhoz) hasonló hatást fejtsen ki.

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely anyag vagy keverék.

Tiroid hatás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes pajzsmirigyhormonhoz (például a T_3-hoz) hasonló hatást gyakoroljon.

Validáció: tudományos folyamat, amelynek célja egy adott vizsgálati módszer működési követelményeinek és korlátjainak jellemzése, valamint megbízhatóságának és egy adott célhoz kapcsolódó relevanciájának igazolása.

▼M4

2. függelék

Az endokrin rendszert károsító anyagok jelen B.7. Vizsgálati módszerrel történő kimutatásához javasolt végpontok

Kötelező végpontok	Nem kötelező végpontok
Súly	
— herék	— petefészkek
— mellékherék	— méh, beleértve a méhnyakat
— mellékvesék	— pajzsmirigy
— prosztata és az ondóhólyagok a koaguláló mirigyekkel együtt	
Kórszövettani vizsgálatok	
— ivarmirigyek:	— hüvelykenet
— herék és	— hím emlőmirigyek
— petefészkek	— agyalapi mirigy
— járulékos nemi szervek:	
— mellékherék,	
— prosztata és az ondóhólyag a koaguláló mirigyekkel együtt	
— méh, beleértve a méhnyakat	
— mellékvese	
— pajzsmirigy	
— hüvely	
Hormonokkal kapcsolatos mérések	
	— a T3 és a T4 szintje a keringési rendszerben
	— a TSH szintje a keringési rendszerben

SZAKIRODALOM

(1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

(2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60

(3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.

(5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. AppéldáulPharmacol. 108: 267-283.

(6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

▼**M4**

(7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

(10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

(11) OECD (2012).Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html

(12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

(13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

(14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.

(16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(17) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

(18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals No440: 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. SZUBAKUT INHALÁCIÓS TOXICITÁS: 28 NAPOS VIZSGÁLAT

ÖSSZEFOGLALÁS

A jelen felülvizsgált B.8. vizsgálati módszert úgy alakították ki, hogy azzal teljes körűen jellemezhető legyen a rövidebb időn (28 napon) belüli ismételt expozícióval, belégzés útján bejuttatott vizsgált vegyi anyag toxicitása, valamint adatokat lehessen gyűjteni a mennyiségi inhalációs kockázatértékelésekhez. Legalább 5 hím és 5 nőstény rágcsálóból álló csoportokat teszünk ki 28 napon át napi 6 órára a) a vizsgált vegyi anyagnak legalább három koncentrációs szinten, b) szűrt levegőnek (negatív kontroll) és/vagy c) a vivőanyagnak (vivőanyaggal kezelt kontroll). Az állatok expozíciója általában heti 5 napon történik, azonban a hét 7 napján történő expozíció is megengedett. Mindig kell hímeket és nőstényeket is vizsgálni, azonban az egyes nemek különböző koncentrációszinteknek is kitehetők, amennyiben ismert, hogy valamelyik nem érzékenyebb a vizsgált vegyi anyagra. Ez a módszer lehetőséget biztosít a vizsgálatvezetőnek, hogy a vizsgált vegyi anyag toxicitásának alaposabb jellemzése érdekében kísérő (a visszafordíthatóság vizsgálatára alkalmazott) csoportokat, bronchoalveoláris átmosást (BAL), neurológiai vizsgálatokat, valamint további klinikai kórtani és kórszövettani értékeléseket is belefoglaljon a vizsgálatba.

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 412. vizsgálati iránymutatásával (2009). A szubakut inhalációs toxicitásra vonatkozó eredeti 412. vizsgálati iránymutatást 1981-ben fogadták el (1). A jelen B.8. (a felülvizsgált 412. vizsgálati iránymutatással egyenértékű) vizsgálati módszert a tudomány jelenlegi állásának megfelelően, valamint a jelenlegi és jövőbeli szabályozási igények kielégítése érdekében frissítették.

2. Ez a módszer lehetővé teszi a vizsgált vegyi anyagnak 28 napon át belégzés útján történő, naponta ismételt expozíció nyomán kialakuló káros hatások jellemzését. A 28 napos szubakut inhalációs toxicitási vizsgálatok során kapott adatok felhasználhatók mennyiségi kockázatelemzési célokra (ha nem követi azokat 90 napos szubkrónikus inhalációs toxicitási vizsgálat [lásd e melléklet B.29. fejezetét]). Ezen adatok információkkal szolgálhatnak továbbá a hosszabb távú vizsgálatok, például a 90 napos szubkrónikus inhalációs toxicitási vizsgálat során használandó koncentrációk kiválasztásához is. E vizsgálati módszer nem kifejezetten nanoanyagok vizsgálatára szolgál. Az e vizsgálati módszer összefüggésében alkalmazott fogalmak meghatározása a jelen fejezet végén, valamint a 39. iránymutatásban (2) található.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

3. A vizsgálat minőségének fokozása és az állatkísérletek minimalizálása érdekében a vizsgálati laboratóriumnak a vizsgálat elvégzése előtt figyelembe kell vennie a vizsgálandó vegyi anyagról rendelkezésre álló minden információt. A megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztását segítő információk közé tartozhat a vizsgált vegyi anyag azonossága, kémiai szerkezete, valamint fizikai és kémiai tulajdonságai, az esetleges *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei, a várható felhasználási terület(ek) és a humán expozíció lehetősége, a szerkezetileg rokon anyagokról rendelkezésre álló (Q)SAR- és toxikológiai adatok, valamint az akut inhalációs toxicitási vizsgálatokból származó adatok. Ha a vizsgálat során neurotoxicitás várható vagy figyelhető meg, a vizsgálatvezető dönthet úgy, hogy a vizsgálat részeként megfelelő értékeléseket is kell végezni, például funkcionális megfigyelési vizsgálatot (FOB) és a motoros aktivitás mérését. Az expozícióknak az egyes vizsgálatokhoz viszonyított időzítése ugyan kritikus lehet, e kiegészítő tevékenységek azonban nem szabad, hogy akadályozzák az vizsgálat alapvető tervezését.

▼M4

4. A maró vagy irritáló hatású vegyi anyagok vizsgálhatók hígítva, olyan koncentrációban, amellyel elérhető a kívánt mértékű toxicitás (lásd a 39. iránymutatást (2)). Az állatok ezen anyagoknak való expozíciója során a célkoncentrációknak kellően alacsonynak kell lenniük ahhoz, hogy ne okozzanak jelentős fájdalmat és szorongást, ugyanakkor elegendőnek kell lenniük ahhoz, hogy a koncentráció-hatás görbe kiterjeszthető legyen a vizsgálat szabályozási és tudományos céljának megfelelő szintekre. E koncentrációkat eseti alapon kell kiválasztani, lehetőleg egy megfelelően megtervezett tartománybehatároló vizsgálat alapján, amely információkkal szolgál a kritikus végpontról, az esetleges irritációs küszöbértékről, valamint a hatás kezdetének idejéről (lásd a 11–13. bekezdést). A választott koncentrációt indokolni kell.

5. Az elhullásközeli állapotban lévő, nyilvánvalóan fájdalmakkal küszködő vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutató állatokat humánus módon el kell pusztítani. Az elhullásközeli állapotban lévő állatokat a vizsgálat során elhullott állatokkal azonos módon kell figyelembe venni. A megjósolható vagy közeli elhullás felismerését segítő iránymutatás, valamint az elhullás közelében lévő vagy súlyosan szenvedő állatok elpusztítására vonatkozó döntési kritériumok a humánus végpontokról szóló OECD-iránymutatásban (3) találhatók.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

6. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal, ivarérett rágcsálókat kell alkalmazni. A javasolt faj a patkány. Más faj használata esetén a döntést indokolni kell.

Az állatok előkészítése

7. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. A véletlen kiválasztás napján az állatoknak 7–9 hetes fiatal, ivarérett egyedeknek kell lenniük. A testsúlyuk a nemenkénti átlagos testsúlytól legfeljebb ± 20 %-kal térhet el. Az állatokat véletlenszerűen választjuk ki, egyedi azonosítóval látjuk el, és a laboratóriumi körülményekhez való szoktatás céljából a vizsgálat megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben tartjuk.

Az állatok tartása

8. Az állatokat a megfigyelések megkönnyítése és összetévesztésük elkerülése érdekében egyedi azonosítóval, lehetőleg bőr alatti jeladóval kell ellátni. A kísérleti állatok tartására használt helyiség hőmérséklete 22 ± 3 °C kell, hogy legyen. A relatív páratartalmat ideális esetben 30–70 %-os tartományban kell tartani, ugyanakkor ez nem feltétlenül lehetséges, ha vivőanyagként vizet használunk. Az expozíció előtt és után az állatokat általában nemek és koncentrációk szerinti csoportokban kell a ketreceikben elhelyezni, azonban az állatok ketrecenkénti számának nem szabad akadályoznia az egyes állatok megfigyelését, és minimalizálnia kell a kannibalizmus és a marakodás okozta veszteségeket. Ha az állatok expozíciója csak orron át történik, szükséges lehet szoktatni azokat a lefogásukra szolgáló csövekhez. Az állatok lefogására szolgáló csövek nem okozhatnak az állatoknak indokolatlan fizikai, termális vagy a mozgásképtelenség okozta stresszt. A lefogás hatással lehet olyan fiziológiai végpontokra, mint a testhőmérséklet (hipertermia) és/vagy a percenkénti légzésvolumen. Amennyiben a rendelkezésre álló általános adatok azt igazolják, hogy ilyen változások nem lépnek fel számottevő mértékben, az állatok lefogására szolgáló csövekhez való előzetes szoktatás mellőzhető. Az aeroszoloknak egész testfelületükön kitett állatokat az expozíció során külön ketrecben kell elhelyezni, hogy a vizsgált aeroszol ne szűrődhessen át a többi állat szőrzetén. Hagyományos és minősített laboratóriumi takarmány alkalmazható – kivéve az expozíció időtartama alatt –, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást.

▼M4

Inhalációs kamrák

9. Az inhalációs kamra kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált vegyi anyag jellegét és a vizsgálat célját. Az előnyben részesítendő expozíciós mód a csak orron keresztüli expozíció (ez magában foglalja a csak a fejet, orrot vagy szájat érintő expozíciót). A csak orron keresztüli expozíció általában előnyben részesítendő a folyékony vagy szilárd aeroszolok, valamint a lecsapódva esetlegesen aeroszolt alkotó gőzök vizsgálata esetén. Előfordulhat, hogy a vizsgálat különleges céljai egész testfelületen keresztüli expozíció alkalmazásával hatékonyabban elérhetők, ezt azonban indokolni kell a vizsgálati jegyzőkönyvben. Egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamra használata esetén a légköri stabilitás biztosítása érdekében a vizsgált állatok összesített „térfogata” nem haladhatja meg a kamra térfogatának 5 %-át. A csak orron át történő és az egész testfelületen keresztüli expozíciós technikák elveivel, valamint azok különös előnyeivel és hátrányaival a 39. iránymutatás (2) foglalkozik.

TOXICITÁSI VIZSGÁLATOK

Határkoncentrációk

10. Az akut vizsgálatoktól eltérően a 28 napos szubakut inhalációs toxicitási vizsgálatok esetén nincsenek meghatározott határkoncentrációk. A maximális vizsgált koncentráció kiválasztásakor a következőket kell figyelembe venni: 1) az elérhető maximális koncentráció, 2) a legrosszabb esetben fennálló humán expozíció szintje, 3) a megfelelő oxigénellátás biztosításának szükségessége és/vagy 4) állatjóléti szempontok. Amennyiben nincsenek adatokon alapuló határértékek, az 1272/2008/EK rendeletben (13) szereplő akut határértékek alkalmazhatók (azaz aeroszolok esetén legfeljebb 5 mg/l, gőzök esetén 20 mg/l, gázok esetén pedig 20 000 ppm); lásd a 39. iránymutatást (2). Amennyiben gázok vagy erősen illékony anyagok (például hűtőfolyadékok) vizsgálata esetén e határértékeket túl kell lépni, a döntést indokolni kell. A határkoncentrációnak egyértelmű toxicitást kell előidéznie anélkül, hogy az állatoknak indokolatlan stresszt okozna vagy befolyásolná az élettartamukat (3).

Tartománybehatároló vizsgálat

11. A fő vizsgálat megkezdése előtt tartománybehatároló vizsgálat elvégzése lehet szükséges. A tartománybehatároló vizsgálat átfogóbb a dózisbehatároló vizsgálatnál, mivel nem korlátozódik a koncentráció kiválasztására. A tartománybehatároló vizsgálat révén szerzett információk hozzájárulhatnak a fő vizsgálat sikeréhez. A tartománybehatároló vizsgálat például technikai jellegű információkkal szolgálhat az analitikai módszerek, a részecskeméretezés, a toxikus hatásmechanizmusok felismerése, a klinikai kórtani és kórszövettani adatok, valamint a fő vizsgálat lehetséges NOAEL- és MTC-koncentrációinak becslése vonatkozásában. A vizsgálatvezető a tartománybehatároló vizsgálatot alkalmazhatja a légzőrendszer irritációs küszöbértékének (például a légzőrendszer kórszövettani elemzése, a tüdő működésének vizsgálata vagy bronchoalveoláris átmosás útján történő) meghatározása, az állatoknak indokolatlan stresszt nem okozó, elfogadható maximális koncentráció, valamint a vizsgált vegyi anyag toxicitását legjobban jellemző paraméterek meghatározása céljából.

12. A tartománybehatároló vizsgálat egy vagy több koncentrációszintre is kiterjedhet. Mindegyik koncentrációszintnek legfeljebb három hím és három nőstény tehető ki. A tartománybehatároló vizsgálatnak legalább 5 napig kell tartania, és általában nem tarthat tovább 14 napnál. A vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell a fő vizsgálathoz kiválasztott koncentrációk indokolását. A fő vizsgálat célja a koncentráció-válasz összefüggésnek a feltételezett legérzékenyebb végpont alapján történő kimutatása. Alsó koncentrációként lehetőleg olyan koncentráció választandó, amelynél nem észlelhető káros hatás, míg a felső koncentrációnak egyértelmű toxicitást kell előidéznie anélkül, hogy az állatoknak indokolatlan stresszt okozna vagy befolyásolná az élettartamukat (3).

▼M4

13. A tartománybehatároló vizsgálat során alkalmazandó koncentrációszintek kiválasztásakor figyelembe kell venni minden rendelkezésre álló információt, beleértve a szerkezet-aktivitás összefüggéseket és a hasonló vegyi anyagok adatait (lásd a 3. bekezdést). A tartománybehatároló vizsgálat megerősítheti, illetve megcáfolhatja a legérzékenyebbnek vélt mechanisztikai alapú végpontokat, például az organofoszfátok kolineszterázgátló hatását, a vörösvérsejtekre toxikus anyagok okozta methemoglobinképződést, a pajzsmirigyre toxikus anyagok esetén a pajzsmirigyhormonokat (T_3, T_4), a fehérjét, az LDH-t, vagy az ártalmatlan, nehezen oldható részecskék vagy a tüdőt irritáló aeroszolok esetén a bronchoalveoláris átmosási folyadékban lévő neutrofileket.

Fő vizsgálat

14. A fő szubakut toxicitási vizsgálat általában három koncentrációszintre, valamint szükség szerint azokkal párhuzamos negatív (levegővel kezelt) és/vagy vivőanyaggal kezelt kontrollokra terjed ki (lásd a 17. bekezdést). A megfelelő expozíciós szintek kiválasztásának elősegítéséhez fel kell használni minden rendelkezésre álló adatot, beleértve a szisztémás toxicitási vizsgálatok eredményeit, az anyagcserére vonatkozó és kinetikai adatokat (különös hangsúlyt kell fektetni a kinetikai folyamatokat telítő magas koncentrációszintek elkerülésére). Mindegyik vizsgált csoport legalább 10 rágcsálóból (5 hím és 5 nőstény egyedből) áll, amelyeket heti 5 napon napi 6 órára teszünk ki a vizsgált vegyi anyagnak 4 héten keresztül (a vizsgálat teljes időtartama 28 nap). Az állatok heti 7 napon is kitehetők a vizsgált anyagnak (például belélegezhető gyógyszerek vizsgálata esetén). Amennyiben ismert, hogy valamelyik nem érzékenyebb a vizsgált vegyi anyagra, az egyes nemek különböző koncentrációszinteknek is kitehetők a 15. bekezdésben ismertetett koncentráció-válasz összefüggés optimális feltárása érdekében. Patkányoktól eltérő rágcsálófajok csak orron át történő expozíciója esetén az expozíció maximális időtartama kiigazítható a fajspecifikus szorongás minimalizálása érdekében. Napi 6 óránál rövidebb expozíciós idő alkalmazása vagy hosszabb időtartamú (például napi 22 órás), egész testfelületen keresztüli expozíciós vizsgálat szükségessége esetén indokolást kell adni (lásd a 39. iránymutatást (2)). Az expozíció időtartama alatt az állatok nem kaphatnak takarmányt, kivéve, ha az időtartam meghaladja a 6 órát. Az állatoknak víz az egész testfelületen keresztüli expozíció teljes időtartama alatt adható.

15. A célkoncentrációkat úgy kell megválasztani, hogy azonosítható(k) legyen(ek) a célszerv(ek) és egyértelmű koncentráció-válasz összefüggés legyen kimutatható:

— A felső koncentrációszintnek toxikus hatásokat kell előidéznie anélkül, hogy késleltetett tüneteket vagy elhullást okozna, ami kizárná az érdemi értékelést.

— A köztes koncentrációszint(ek)et úgy kell felosztani, hogy a toxikus hatások fokozatosan növekedjenek az alsó és a felső koncentrációszint között.

— Az alsó koncentrációszint nem, vagy csak kis mértékben idézheti elő toxicitás jeleit.

Kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálat

16. Kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálat végezhető a toxicitás visszafordíthatóságának, elhúzódó vagy késve fellépő voltának a kezelést követő megfelelő hosszúságú, de legalább 14 napos időszak során történő megfigyelése érdekében. A kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálathoz használt csoportok öt hímből és öt nőstényből állnak, amelyeket a fő vizsgálatban megfigyelt kísérleti állatokkal egyidejűleg teszünk ki a vizsgált vegyi anyagnak. A kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálathoz használt csoportokat a legnagyobb koncentrációban kell kitenni a vizsgált vegyi anyagnak, és ezzel párhuzamosan szükség szerint levegővel és/vagy vivőanyaggal kezelt kontrollok vizsgálatát is el kell végezni (lásd a 17. bekezdést).

▼M4

Kontrollállatok

17. A párhuzamosan vizsgált negatív (levegővel kezelt) kontrollállatokat a vizsgált csoportokban lévő állatokkal azonos módon kell kezelni, azzal a különbséggel, hogy a vizsgált vegyi anyag helyett szűrt levegőnek tesszük ki azokat. Amennyiben vizet vagy más anyagot használunk a vizsgálati légkör létrehozásának elősegítésére, a vizsgálathoz negatív (levegővel kezelt) kontrollcsoport helyett vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportot kell alkalmazni. Vivőanyagként lehetőség szerint vizet kell használni. Ha a vivőanyag víz, a kontrollállatokat ugyanolyan relatív páratartalmú levegőnek kell kitenni, mint a vizsgált anyagnak kitett csoportokat. Az alkalmas vivőanyag kiválasztásának megfelelően elvégzett előzetes vizsgálaton vagy múltbeli adatokon kell alapulnia. Ha a vivőanyag toxicitásáról nincsenek részletes információk, a vizsgálatvezető dönthet úgy, hogy negatív (levegővel kezelt) és vivőanyaggal kezelt kontrollt egyaránt alkalmazni kell, ez azonban erősen ellenjavallt. Ha a múltbeli adatok alapján a vivőanyag nem toxikus, nincs szükség negatív (levegővel kezelt) kontrollcsoportra, és ez esetben csak vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportot kell alkalmazni. Amennyiben a vivőanyaggal kevert vizsgált vegyi anyag az előzetes vizsgálat alapján nem bizonyul toxikusnak, a vizsgált koncentráció mellett a vivőanyag sem tekintendő toxikusnak, és ezt a vivőanyagkontrollt kell használni.

EXPOZÍCIÓS KÖRÜLMÉNYEK

A koncentrációk beadása

18. Az állatokat gáz, gőz, aeroszol vagy ezek keveréke formájában tesszük ki a vizsgált vegyi anyagnak. A vizsgálandó halmazállapot a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, a kiválasztott koncentrációtól és/vagy a vizsgált vegyi anyag kezelése és használata során legnagyobb valószínűséggel előforduló halmazállapottól függ. A higroszkopikus és kémiailag reakcióképes vizsgált vegyi anyagokat száraz levegős körülmények között kell vizsgálni. Ügyelni kell a robbanékony koncentrációk keletkezésének elkerülésére. A részecskéket képző anyagok mechanikai eljárásoknak vethetők alá a részecskeméret csökkentése érdekében. További útmutatás a 39. iránymutatásban (2) olvasható.

Részecskeméret-eloszlás

19. Minden aeroszol, valamint a lecsapódva esetlegesen aeroszolt alkotó gőzök esetén részecskeméretezést kell végezni. A légzőrendszer összes lényeges részének expozíciója érdekében 1 és 3 μm közötti tömegfelező aerodinamikai átmérővel (MMAD) rendelkező, az 1,5 és 3,0 közötti tartományba eső geometriai szórású (σ_g) aeroszolok használata javasolt (4). Habár ésszerű keretek között törekedni kell az e szabványnak való megfelelésre, szakértői megítélésre kell hagyatkozni, ha erre nincs lehetőség. A fémgőzök részecskéi például kisebbek lehetnek e szabványos méretnél, míg a töltéssel rendelkező részecskék és a rostok meghaladhatják azt.

A vizsgált vegyi anyag előkészítése vivőanyagban

20. A vizsgált vegyi anyag ideális esetben vivőanyag nélkül vizsgálandó. Ha a vizsgált vegyi anyag megfelelő koncentrációjának és részecskeméretének előállításához vivőanyag alkalmazása szükséges, a víz részesítendő előnyben. Ha a vizsgált vegyi anyagot vivőanyagban oldjuk fel, minden esetben igazolni kell annak stabilitását.

AZ EXPOZÍCIÓS KÖRÜLMÉNYEK NYOMON KÖVETÉSE

Kamrabeli légáramlás

21. Az expozíciós kamrán keresztüli légáramlást gondosan szabályozni kell, folyamatosan nyomon kell követni, és minden expozíció során legalább óránként fel kell jegyezni. A vizsgálati légköri koncentráció (vagy időbeli stabilitás) valós idejű nyomon követése valamennyi dinamikus paraméter globális mérését jelenti, és közvetett lehetőséget nyújt valamennyi lényeges

▼M4

dinamikus inhalációs paraméter szabályozására. A koncentráció valós idejű nyomon követése esetén a légáramlásokat elegendő expozíciónként és naponként egy alkalommal mérni. Különös figyelmet kell fordítani a csak orron át történő expozícióra szolgáló kamrában az újbóli belélegzés elkerülésére. Az oxigénkoncentrációnak legalább 19 %-nak kell lennie, a szén-dioxid-koncentráció pedig legfeljebb 1 % lehet. Amennyiben feltételezhető, hogy ez a szabvány nem teljesíthető, az oxigén- és szén-dioxid-koncentrációt mérni kell. Ha az expozíció első napján végzett mérések azt mutatják, hogy e gázok szintje megfelelő, rendszerint nincs szükség további mérésekre.

A kamra hőmérséklete és relatív páratartalma

22. A kamra hőmérsékletét 22 ± 3 °C-on kell tartani. Az állatok belégzési zónájában fennálló relatív páratartalmat a csak orron át történő és az egész testfelületen keresztüli expozíció esetén egyaránt folyamatosan nyomon kell követni, és lehetőség szerint minden expozíció során óránként fel kell jegyezni. A relatív páratartalmat lehetőség szerint 30–70 %-os tartományban kell tartani, ugyanakkor előfordulhat, hogy ez vagy nem érhető el (például vízalapú keverékek vizsgálata esetén), vagy nem mérhető a vizsgált vegyi anyag vizsgálati módszerrel való interferenciája miatt.

Vizsgált vegyi anyag: névleges koncentráció

23. Az expozíciós kamrában fennálló névleges koncentrációt lehetőség szerint ki kell számítani és fel kell jegyezni. A névleges koncentrációt úgy kapjuk meg, hogy az előállított vizsgált vegyi anyag tömegét elosztjuk az inhalációs kamrarendszeren áthaladt levegő össztérfogatával. A névleges koncentráció nem az állatok expozíciójának jellemzésére szolgál, ugyanakkor a névleges és a tényleges koncentráció összehasonlításával megismerhető a vizsgálati rendszer előállítási hatásfoka, és így feltárhatók az előállítással összefüggő problémák.

Vizsgált vegyi anyag: tényleges koncentráció

24. A tényleges koncentráció a vizsgált vegyi anyagnak az inhalációs kamrán belül, az állatok belégzési zónájában végzett mintavétellel megállapított koncentrációját jelenti. A tényleges koncentráció vagy specifikus módszerekkel (például közvetlen mintavétellel, adszorpciós vagy kémiai reakcióképességet vizsgáló módszerekkel, valamint utólagos analitikai jellemzéssel), vagy nem specifikus módszerekkel, például gravimetriai szűrőelemzéssel határozható meg. A gravimetriai elemzés csak egykomponensű, por alakú aeroszolok, illetve alacsony illékonyságú folyadékok aeroszoljai esetén elfogadható, és alkalmazását a vizsgált vegyi anyag megfelelő, a vizsgálat előtt végzett jellemzésével kell alátámasztani. A gravimetriai elemzés a többkomponensű, por alakú aeroszolok koncentrációjának meghatározására szintén alkalmazható. Ebben az esetben azonban analitikai adatokkal kell alátámasztani, hogy a levegőben lévő anyag összetétele hasonló a kiindulási anyagéhoz. Amennyiben ilyen információ nem áll rendelkezésre, a (lehetőleg levegőben lebegő) vizsgált vegyi anyag rendszeres időközönként végzett újbóli elemzésére lehet szükség a vizsgálat során. Olyan aeroszolizálódott ágensek esetén, amelyek elpárologhatnak vagy szublimálhatnak, igazolni kell, hogy mindegyik fázisból a választott módszerrel vettünk mintát.

25. Lehetőség szerint a vizsgált vegyi anyag egyetlen tételét kell használni a vizsgálat teljes időtartama alatt, és a vizsgált mintát olyan körülmények között kell tárolni, hogy megőrződjön annak tisztasága, homogenitása és stabilitása. A vizsgálat megkezdését megelőzően el kell végezni a vizsgált vegyi anyag jellemzését, meghatározva többek között annak tisztaságát, valamint amennyiben technikailag lehetséges, az észlelt szennyező anyagok és szennyeződések azonosságát és mennyiségét. Ez többek között – de nem kizárólag – a következő adatokkal mutatható ki: retenciós idő és relatív csúcsterület, tömegspektroszkópiai vagy gázkromatográfiás elemzéssel, illetve más becslésekkel meghatározott molekulatömeg. Bár a vizsgált minta azonosságának meghatározása nem tartozik a vizsgálati laboratórium feladatai közé, óvatosságból érdemes lehet a vizsgálati laboratóriumban legalábbis korlátozott módon (például szín, fizikai jelleg stb. alapján) megerősíteni a megbízó által adott jellemzést.

▼M4

26. Az expozíciós légkört amennyire csak lehet, állandó állapotban kell tartani. Az expozíciós körülmények stabilitásának bizonyítására valós idejű nyomonkövetési eszköz – például aeroszolok esetén aeroszolfotométer, vagy gőzök esetén az összes szénhidrogéntartalmat elemző műszer – alkalmazható. A kamrabeli tényleges koncentrációt minden expozíciós napon minden expozíciós szint tekintetében legalább háromszor meg kell mérni. Ha az alacsony légáramlási sebesség vagy koncentráció miatt ez nem megoldható, expozíciós időszakonként egy mintavétel is elfogadható. Ideális esetben ezt a mintavételt a teljes expozíciós időszak folyamán kell elvégezni. Az egyes kamrakoncentráció-minták gázok és gőzök esetén legfeljebb ± 10 %-kal, folyékony vagy szilárd aeroszolok esetén pedig legfeljebb ± 20 %-kal térhetnek el a kamrabeli átlagkoncentrációtól. A kamra egyensúlyi állapotának kialakulásához szükséges időt (t_{95}) ki kell számítani és jegyzőkönyvezni kell. Egy adott expozíció időtartama magában foglalja a vizsgált vegyi anyag előállításának idejét. Ehhez figyelembe kell venni a kamra egyensúlyi állapotának eléréséhez és a bomláshoz szükséges időt (t_{95}). A t_{95} becsléséhez a 39. iránymutatásban (2) található útmutatás.

27. A nagyon összetett, gázokból/gőzökből és aeroszolokból álló keverékek (például égési légkörök, valamint meghatározott célra szolgáló végfelhasználói termékekből/készülékekből kibocsátott vizsgált vegyi anyagok) esetén az egyes fázisok eltérően viselkedhetnek az inhalációs kamrában. Éppen ezért mindegyik fázishoz (gáz/gőz és aeroszol) legalább egy indikátoranyagot (analitot) – általában a keverék elsődleges hatóanyagát – kell kiválasztani. Amennyiben a vizsgált vegyi anyag keverék, az analitikai koncentrációt a teljes keverék, nem pedig csak az aktív összetevő vagy az indikátoranyag (analit) vonatkozásában kell a jegyzőkönyvben feltüntetni. A tényleges koncentrációról további információ a 39. iránymutatásban található (2).

Vizsgált vegyi anyag: részecskeméret-eloszlás

28. Az aeroszolok részecskeméret-eloszlását mindegyik koncentrációszint tekintetében legalább hetente meg kell határozni sorozatos ütközésmérő vagy alternatív műszer, például aerodinamikai részecskeméret-meghatározó (APS) segítségével. Ha bizonyítható, hogy a sorozatos ütközésmérővel és az alternatív műszerrel kapott eredmények egyeznek, az alternatív műszer a teljes vizsgálat folyamán használható.

29. Az elsődleges műszerrel párhuzamosan egy második eszközt, például gravimetriai szűrőt vagy impingert/gázbuborékoltatót kell használni az elsődleges műszer mintavételi hatékonyságának megerősítése érdekében. A részecskeméret-elemzés útján kapott tömegkoncentrációnak a szűrőelemzéssel kapott tömegkoncentrációt ésszerű mértékben meg kell közelítenie (lásd a 39. iránymutatást (2)). Ha a vizsgálat kezdeti szakaszában vizsgált összes koncentrációnál bizonyítható az egyezés, a további megerősítő mérések mellőzhetők. Az állatok jóléte érdekében intézkedéseket kell tenni a vizsgálat eseteges megismétlését szükségessé tevő kétes adatok előfordulásának minimalizálása érdekében.

30. Gőzök esetén részecskeméretezést kell végezni, ha fennáll annak a lehetősége, hogy a gőz lecsapódásával aeroszol keletkezhet, vagy ha vegyes fázisok alkotására képes részecskéket észlelünk a gőzatmoszférában.

MEGFIGYELÉSEK

31. Az állatokat expozíciós időtartam előtt, alatt és után klinikai megfigyeléseknek kell alávetni. Az állatok expozíció során megfigyelt reakciójától függően gyakoribb megfigyelések is kilátásba helyezhetők. Ha az állatok megfigyelését az azok lefogására szolgáló csövek használata, az egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamra rossz megvilágítása vagy az átlátszatlan légkör akadályozza, az állatokat az expozíció után alapos megfigyelésnek kell alávetni. A következő napi expozíció előtt végzett megfigyelésekkel felmérhető a toxikus hatások visszafordíthatósága vagy súlyosbodása.

▼M4

32. Minden megfigyelést rögzíteni kell olyan módon, hogy minden állat esetében önálló adatsort veszünk fel. Ha az állatokat humánus okok miatt el kell pusztítani, vagy ha azok elhullnak, a lehető legpontosabban fel kell jegyezni az elhullás időpontját.

33. A ketrecben tartott állatok megfigyelésének ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártya, a légző-, keringési és idegrendszer, valamint a szomatomotoros aktivitás és a viselkedési minták változásaira. Figyelmet kell szentelni a remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma megfigyelésére. A végbélben mért hőmérséklet bizonyítékot szolgáltathat a kezelés vagy a fogság okozta bradipnoés reflexre vagy hipo-/hipertermiára. A vizsgálati protokollba további értékelések is felvehetők, ilyenek például a kinetikai vizsgálatok, a biomonitoring, a tüdőműködés vizsgálata, a tüdőszövetben felgyülemlő, rosszul oldható anyagok visszamaradásának vizsgálata, valamint a viselkedésbeli változások megfigyelése.

TESTSÚLY

34. Az egyes állatok súlyát röviddel az első expozíció (0. nap) előtt, azt követően pedig hetente kétszer (például az expozíció nélküli hétvégén végbement felépülés bizonyítása céljából pénteken és hétfőn, vagy a szisztémás toxicitás felmérését lehetővé tevő időközönként), valamint az elhullás vagy elpusztítás időpontjában fel kell jegyezni. Amennyiben az első 2 héten semmilyen hatás nem figyelhető meg, a vizsgálat hátralevő részében a testsúly heti rendszerességgel is mérhető. A kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálatban alkalmazott állatok (ha vannak) súlyának heti rendszerességgel végzett mérését a felépülési időszak során is folytatni kell. A vizsgálat lezárásakor minden állat súlyát meg kell mérni röviddel az elpusztítás előtt, hogy torzításmentesen kiszámítható legyen a szervek súlyának testsúlyhoz viszonyított aránya.

TÁPLÁLÉK- ÉS VÍZFOGYASZTÁS

35. A felvett táplálék mennyiségét heti rendszerességgel le kell mérni. A felvett víz mennyisége szintén mérhető.

KLINIKAI PATOLÓGIA

36. Minden állaton – beleértve a kontroll- és kísérő (visszafordíthatósági) csoportokba tartozókat – klinikai patológiai értékelést kell végezni az elpusztításkor. Az expozíció vége és a vérvétel között eltelt időt fel kell jegyezni, különösen ha az adott végpontra gyors regeneráció jellemző. A rövid plazmabeli felezési idejű paramétereknél (például COHb, CHE és MetHb) az expozíció végét követően végzendő mintavétel.

37. A minden toxikológiai vizsgálathoz általánosan előírt klinikai patológiai paraméterek felsorolása az 1. táblázatban található. Rendszeres vizeletelemzés nem kötelező, de elvégezhető, ha a várt vagy megfigyelt toxicitás alapján célszerűnek ítéljük. A vizsgálatvezető a vizsgált vegyi anyag toxicitásának alaposabb jellemzése érdekében további paraméterek értékelése mellett dönthet (például kolineszteráz, lipidek, hormonok, sav-bázis egyensúly, methemoglobin vagy Heinz-testek, kreatin-kináz, csontvelő/eritroid arány, troponinok, artériás vérgáz, laktát-dehidrogenáz, szorbit-dehidrogenáz, glutamát-dehidrogenáz és gamma-glutamil-transzpeptidáz).

▼M4

1. táblázat

Szabványos klinikai patológiai paraméterek

Hematológiai paraméterek	
vörösvértestszám	teljes vérkép
hematokrit	differenciált vérkép
hemoglobinkoncentráció	trombocitaszám
átlagos korpuszkuláris hemoglobin	véralvadási képesség (a következők egyikét kell választani):
átlagos korpuszkuláris térfogat	— prothrombin idő
átlagos korpuszkuláris hemoglobinkoncentráció	— véralvadási idő
retikulociták	— részleges prothrombin idő
Klinikai kémiai paraméterek	
glükóz (*)	alanin-aminotranszferáz
összes koleszterin	aszpartát-aminotranszferáz
trigliceridek	alkáli foszfatáz
a vérben lévő karbamid-nitrogén	kálium
összes bilirubin	nátrium
kreatinin	kalcium
összes fehérje	foszfor
albumin	klorid
globulin	
Vizeletelemzés (nem kötelező)	
megjelenés (szín és zavarosság)	összes fehérje
térfogat	glükóz
fajsúly vagy ozmolaitás	vér/vérsejtek
pH	

(*) Mivel a hosszas koplaltatás torzíthatja a kezelt állatok glükózszintjének a kontrollállatokéhoz viszonyítva mért értékét, a vizsgálatvezetőnek döntenie kell, hogy célszerű-e az állatokat koplaltatni. Koplaltatási idő alkalmazása esetén annak a vizsgált fajhoz kell igazodnia, patkány esetén például 16 óra lehet (éjszakai koplaltatás). A koplaltatás mellett mérhető glükózszint meghatározása az utolsó expozíciós héten történő éjszakai koplaltatás után, vagy a boncolás előtti éjszakai koplaltatás után végezhető el (utóbbi esetben az összes többi klinikai patológiai paraméterrel együtt kell meghatározni).

38. Amennyiben arra utaló bizonyítékot találunk, hogy az alsó légutak (azaz az alveolusok) jelentik a lerakódás és a visszamaradás elsődleges helyét, a bronchoalveoláris átmosás (BAL) lehet a legalkalmasabb technika a hipotézisen alapuló dózis-hatás paraméterek alveolitiszre, tüdőgyulladásra és foszfolipidózisra összpontosító mennyiségi elemzéséhez. Ez lehetővé teszi az alveolusok károsodása dózis-válasz és idő-lefolyás típusú változásainak megfelelő vizsgálatát. A BAL eljárás útján nyert folyadék elemezhető teljes és differenciált vérkép, összes fehérje, valamint laktát-dehidrogenáz tekintetében. Figyelembe vehetők továbbá egyéb, lizoszómakárosodásra, foszfolipidózisra, fibrózisra, valamint irritáció okozta vagy allergiás gyulladásra utaló paraméterek is, ami magában foglalhatja a gyulladást serkentő citokinek/kemokinek meghatározását. A BAL-mérések általában kiegészítik a kórszövettani vizsgálatok eredményeit, azonban nem helyettesíthetik azokat. A tüdőátmosás elvégzéséhez a 39. iránymutatásban (2) található útmutatás.

▼M4

MAKROSZKOPIKUS PATOLÓGIA ÉS A SZERVEK SÚLYA

39. Minden kísérleti állaton teljes kivéreztetést és (ha lehetséges) makroszkopikus boncolást kell végezni, beleértve azokat is, amelyek a vizsgálat során elpusztultak, vagy amelyeket állatjóléti okok miatt el kellett távolítani a vizsgálatból. Minden egyes állatnál fel kell jegyezni az utolsó expozíció és az elpusztítás között eltelt időt. Ha a boncolás nem végezhető el rögtön azután, hogy az elpusztult állatot észrevettük, az állatot hűtve (nem fagyasztva) kell tárolni az autolízis minimalizálásához kellően alacsony hőmérsékleten. A boncolást a lehető leghamarabb, általában egy vagy két napon belül el kell végezni. Minden állat esetén fel kell jegyezni minden makroszkopikus patológiai elváltozást, különös tekintettel a légzőrendszert érintő változásokra.

40. A makroszkopikus boncolás során kórszövettani vizsgálat céljából megfelelő közegben megőrizendő szervek és szövetek felsorolása a 2. táblázatban található. A [szögletes zárójelben] feltüntetett szervek és szövetek, valamint bármely egyéb szerv és szövet megőrzéséről a vizsgálatvezető saját mérlegelése alapján dönthet. A **félkövérrel** szedett szerveket a kiszáradás elkerülése érdekében a boncolás után a lehető legrövidebb időn belül meg kell tisztítani, és azok nedves súlyát meg kell mérni. A pajzsmirigy és a mellékherék súlyát csak akkor javasolt megmérni, ha szükséges, mivel az azok megtisztítása során keletkező mesterséges elváltozások akadályozhatják a kórszövettani értékelést. A szöveteket és a szerveket közvetlenül a boncolás után, és az alkalmazandó fixálószertől függően legalább 24–48 órával a megtisztítás előtt 10 %-os pufferelt formalinban vagy egyéb, megfelelő fixálószerben fixálni kell.

2. táblázat

A makroszkopikus boncolás során megőrizendő szervek és szövetek

Mellékvesék	Ondóhólyagok
Csontvelő (és/vagy friss felszívott minta)	Gerincoszlop (nyaki, mellkasi középső és ágyéki szakasz)
Agy (beleértve a nagyagy, a kisagy és a nyúltvelő/nyúltagyi híd metszeteit)	**Lép**
[Szemek (retina, látóideg) és szemhéjak]	Gyomor
Szív	**Herék**
Vesék	**Csecsemőmirigy**
Gégefő (3 szinten, amelyek egyikének tartalmaznia kell a gégefedő alapját)	Pajzsmirigy
Máj	Légcső (legalább 2 szinten, beleértve egy hosszirányú metszetet a carinán keresztül, valamint egy keresztmetszetet)
Tüdő (egy szinten készített metszet mindegyik lebenyről, beleértve a fő hörgőket)	[Húgyhólyag]
Nyirokcsomók a tüdő hilusok körüli részéről, különösen nehezen oldható, szemcsés vizsgált vegyi anyagok esetén. Alaposabb vizsgálatok és/vagy immunológiára összpontosító tanulmányok esetében további nyirokcsomók megőrzése is megfontolható, például a gátori, nyaki/állkapocs alatti és/vagy fülcse körüli részekről.	Méh
	Minden makroszkopikus elváltozás
Orr-garati szövetek (legalább 4 szinten, amelyek egyikének tartalmaznia kell az orr-garati csatornát és az orrhoz társuló nyirokszövetet [NALT])	
Nyelőcső	
[Szaglógumó]	
Petefészkek	

▼M4

41. A tüdőt sértetlenül kell eltávolítani, le kell mérni, és a tüdő szerkezetének megőrzése érdekében megfelelő fixálószert kell belecsepegtetni 20-30 cm víznek megfelelő nyomáson (5). Mindegyik lebenyről metszetet kell készíteni egy szinten, beleértve a fő hörgőket, ugyanakkor tüdőátmosás alkalmazása esetén az át nem mosott lebenyről három szinten kell metszetet készíteni (nem sorozatos metszeteket).

42. Az orr-garati szöveteket legalább 4 szinten kell vizsgálni, amelyek egyikének tartalmaznia kell az orr-garati csatornát (5, 6, 7, 8, 9), lehetővé téve a laphámsejtes, átmeneti (csillószőrrel nem borított légúti), légúti (csillószőrrel borított) és szaglóhámszövet, valamint az elvezető nyirokszövet (NALT, 10, 11) megfelelő vizsgálatát. A gégefőt három szinten kell vizsgálni, amelyek egyikének tartalmaznia kell a gégefedő alapját (12). A légcsövet legalább két szinten kell vizsgálni, beleértve egy hosszirányú metszetet az extrapulmonális hörgők elágazásánál lévő carinán keresztül, valamint egy keresztmetszetet.

KÓRSZÖVETTANI VIZSGÁLATOK

43. A 2. táblázatban felsorolt összes szerv és szövet kórszövettani vizsgálatát el kell végezni a kontrollcsoportoknál és a magas koncentrációnak kitett csoportoknál, valamint a vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított összes állatnál. Különös figyelmet kell fordítani a légzőrendszerre, a célszervekre, valamint a makroszkopikus elváltozásokra. Azon szerveket és szöveteket, amelyeken a magas koncentrációnak kitett csoportnál elváltozások figyelhetők meg, mindegyik csoportnál meg kell vizsgálni. A vizsgálatvezető a koncentráció-válasz összefüggés egyértelmű kimutatása érdekében dönthet úgy, hogy további csoportoknál is végezni kell kórszövettani értékelést. Kísérő (visszafordíthatóság vizsgálatára szolgáló) csoport alkalmazása esetén minden olyan szerv és szövet kórszövettani értékelését el kell végezni, amelynél a kezelt csoportok egyedei esetében elváltozások figyelhetők meg. Ha a magas koncentrációnak kitett csoportnál túlzott mértékű idő előtti elhullás vagy egyéb problémák veszélyeztetik az adatok szignifikanciáját, az eggyel alacsonyabb koncentrációra vonatkozóan kell kórszövettani vizsgálatot végezni. Meg kell kísérelni a makroszkopikus és mikroszkopikus megfigyelések közötti összefüggések feltárását.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

44. Meg kell adni az egyes állatok testsúlyára, táplálékfelvételére, klinikai patológiai eredményeire, makroszkopikus boncolási eredményeire, szerveinek súlyára, valamint kórszövettani eredményeire vonatkozó adatokat. A klinikai megfigyelések adatait táblázatos formában össze kell foglalni, minden egyes vizsgált csoporthoz megadva a csoportban lévő állatok számát, a specifikus mérgezési tüneteket mutató, valamint a vizsgálat során elhullott vagy humánus okokból elpusztított állatok számát, az egyes állatok elhullásának időpontját, a toxikus hatások leírását, időbeli lefolyását és visszafordíthatóságát, valamint a boncolások eredményeit. Mind a számszerű, mind a járulékos eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell kiértékelni. Bármilyen általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazható, és a statisztikai módszereket a vizsgálat tervezésekor kell kiválasztani.

Vizsgálati jegyzőkönyv

45. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell értelemszerűen tartalmaznia:

Kísérleti állatok és azok tartása

— A ketrecben való tartás körülményei, beleértve különösen az állatok ketrecenkénti számát (vagy számának változását), az alom anyagát, a környezeti hőmérsékletet és a relatív páratartalmat, a megvilágítás időtartamát, valamint a takarmány meghatározását.

▼M4

— A vizsgált faj/törzs, valamint a patkánytól eltérő faj alkalmazásának indokolása. Forrás és múltbéli adatok is megadhatók, amennyiben azokat hasonló expozíciós, tartási és koplaltatási körülményeknek kitett állatokon gyűjtötték.

— Az állatok száma, kora és neme.

— A véletlen kiválasztás módszere.

— A vizsgálat előtti esetleges kondicionálás leírása, beleértve a takarmányozást, a karantént és a betegségek kezelését.

Vizsgált vegyi anyag

— Fizikai jelleg, tisztaság, valamint – ha lényeges – fizikai és kémiai tulajdonságok (beleértve az izomerizációt).

— Azonosító adatok és – amennyiben ismert – a Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám).

Vivőanyag

— A vivőanyag használatának, valamint megválasztásának indokolása (ha a vivőanyag nem víz).

— Múltbeli vagy párhuzamosan kapott adatok, amelyek igazolják, hogy a vivőanyag nem befolyásolja a vizsgálat eredményét.

Inhalációs kamra

— Az inhalációs kamra részletes leírása, beleértve annak térfogatát és vázlatrajzát is.

— Az állatok expozíciójához és a légkör előállításához használt berendezések eredete és leírása.

— A hőmérséklet, a páratartalom, a részecskeméret és a tényleges koncentráció mérésére szolgáló berendezések.

— A levegő forrása és a kondicionáló rendszer.

— Az eszközök homogén vizsgálati légkör biztosítása érdekében történő kalibrálására alkalmazott módszerek.

— Nyomáskülönbség (pozitív vagy negatív).

— Expozíciós nyílások száma kamránként (csak orron keresztüli expozíció), az állatok helye a kamrában (egész testfelületen keresztüli expozíció).

— A vizsgálati légkör stabilitása.

— A hőmérséklet- és páratartalom-érzékelők, valamint a vizsgálati légkör mintavételének helye a kamrában.

— A bevitt/elszívott levegő kezelése.

— Légáramlási sebességek, légáramlási sebesség expozíciós nyílásonként (csak orron keresztüli expozíció), vagy az állatok terhelése kamránként (egész testfelületen keresztüli expozíció).

— Az inhalációs kamra egyensúlyi állapotának eléréséhez szükséges idő (t95).

— A térfogatváltozások óránkénti száma.

— Mérőberendezések (ha vannak).

Expozíciós adatok

— A fő vizsgálathoz kiválasztott célkoncentráció indokolása.

▼M4

— Névleges koncentrációk (az inhalációs kamrába való bejuttatásra előállított vizsgált vegyi anyag össztömege osztva a kamrán áthaladt levegő térfogatával).

— A vizsgált vegyi anyagnak az állatok belégzési zónájából gyűjtött tényleges koncentrációi; a heterogén halmazállapotokat (gáz, gőz, aeroszol) felvevő keverékek esetén mindegyik külön elemezhető.

— Minden levegőbeli koncentrációt tömegegységekben (mg/l, mg/m^3 stb.), nem pedig térfogategységekben (ppm, ppb stb.) kell megadni.

— Részecskeméret-eloszlás, tömegfelező aerodinamikai átmérő (MMAD), valamint geometriai szórás (σ_g), beleértve kiszámításuk módját is. Jegyzőkönyvezni kell az egyes részecskeméret-elemzéseket.

Vizsgálati körülmények

— A vizsgált vegyi anyag előkészítésének részletei, beleértve a szilárd anyagok részecskeméretének csökkentésére vagy a vizsgált vegyi anyag oldatainak elkészítésére esetlegesen alkalmazott eljárások részleteit is.

— A vizsgálati légkör előállítására és az állatok vizsgálati légkörnek való expozíciójára alkalmazott berendezések leírása (lehetőség szerint vázlatrajzzal).

— A kamrabeli hőmérséklet, páratartalom és légáramlás megfigyelésére használt berendezések részletei (kalibrációs görbe meghatározása).

— A kamrabeli koncentráció és részecskeméret-eloszlás meghatározásához alkalmazott minták gyűjtésére használt berendezések részletei.

— Az alkalmazott kémiai analitikai módszer és a módszer validációjának részletei (beleértve a vizsgált vegyi anyag mintavételi közegből való visszanyerésének hatásfokát is).

— Az állatok vizsgálati és kontrollcsoportokba való besorolásához alkalmazott véletlen kiválasztási módszer.

— A táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány típusa/eredete, a víz eredete).

— A vizsgált koncentrációk kiválasztásának indokolása.

Eredmények

— A kamrabeli hőmérséklet, páratartalom és légáramlás értékeinek táblázatos összefoglalása.

— A kamrabeli névleges és tényleges koncentráció adatainak táblázatos összefoglalása.

— Részecskeméret-adatok táblázatos összefoglalása, beleértve az analitikai mintavételi adatokat, a részecskeméret-eloszlást, valamint az MMAD és a σ_g számításait is.

— A válaszadatok és a koncentrációszintek táblázatos összefoglalása minden egyes állatra (azaz a mérgezési tüneteket mutató és köztük az elhullt állatokra) vonatkozóan (ideértve a hatások jellegét, súlyosságát, megjelenésének időpontját és időtartamát is).

▼M4

— Az egyes állatok súlyának táblázatos összefoglalása.

— A táplálékfelvétel táblázatos összefoglalása.

— A klinikai patológiai adatok táblázatos összefoglalása.

— A boncolások és, ha rendelkezésre állnak, a kórszövettani vizsgálatok eredményei minden egyes állatra vonatkozóan.

— Minden egyéb mért paraméter táblázatos összefoglalása.

Az eredmények szöveges értékelése és értelmezése

— Különös hangsúlyt kell fektetni az e vizsgálati módszerben – például a határkoncentráció vagy a részecskeméret kapcsán – előírt feltételeknek való megfelelés érdekében alkalmazott módszerek leírására.

— Ki kell térni a részecskék belélegezhetőségére az általános megállapítások tükrében, különösen ha a részecskeméretre vonatkozó feltételek nem teljesültek.

— A vizsgálat általános értékelésének ismertetnie kell a névleges és a tényleges koncentrációk meghatározására használt módszerek következetességét, valamint a tényleges és a névleges koncentráció közötti összefüggést.

— Ki kell térni az elhullás valószínű okára, valamint az elsődleges hatásmechanizmusra (szisztémás vagy helyi).

— Magyarázatot kell szolgáltatni, amennyiben a humánus végpontokról szóló OECD-iránymutatás (3) szerinti kritériumok alapján humánus módon el kellett pusztítani a fájdalommal küszködő vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutató állatokat.

— Meg kell jelölni a célszerve(ke)t.

— Meg kell határozni a NOAEL és a LOAEL értékét.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appéldául Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Az Európai Parlament és a Tanács 2008. december 16-i 1272/2008/EK rendelete az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról, HL L 353., 2008.12.31., 1. o.

▼**M4**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁS

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼B

B.9. **ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ (28 NAPOS) TOXICITÁS (DERMÁLIS)**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (B).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot naponta adagolják a bőrre, fokozatosan növekvő dózisokban több kísérleti állatcsoportnak, 28 napon keresztül. A vizsgálati időszak alatt az állatokat naponta kell vizsgálni a toxicitás tüneteinek észlelése érdekében. A vizsgálat során elpusztult állatokat és a vizsgálat végéig életben maradó állatokat is fel kell boncolni.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napig a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell osztani. A vizsgálat megkezdése előtt nem sokkal le kell nyírni a szőrt a törzs háti oldaláról. Borotválni is lehet, de azt a vizsgálat megkezdése előtt megközelítőleg 24 órával kell elvégezni. A vizsgálat során általában ismételt nyírás és borotválás szükséges, rendszerint heti időközönként. A nyírás vagy borotválás során gondosan ügyelni kell arra, hogy a bőr ne sérüljön meg. A testfelület legalább 10 %-át szabaddá kell tenni a vizsgált anyag alkalmazásához. Az állat súlyát is tekintetbe kell venni, amikor a lecsupaszítandó felületről, illetve a kezelt felület nagyságáról döntenek. Ha szilárd anyagot vizsgálnak, amelyet adott esetben porítani is lehet, az anyagot vízzel kellően át kell nedvesíteni, vagy szükség esetén vivőanyagot kell alkalmazni annak biztosítására, hogy az minél jobban tapadjon a bőrhöz. A folyékony vizsgált anyagokat rendszerint hígítás nélkül kell adagolni. Az adagolás heti öt-hét alkalommal történik.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

1.6.2.1. *A kísérlethez használt állatok*

Kifejlett patkány, nyúl vagy tengerimalac használható. Más faj is használható, de azok használatát meg kell indokolni.

▼B

A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan, az átlagértéktől maximum ± 20 %-kal térhet el.

1.6.2.2. *Az állatok száma és neme*

Minden adagolási szinthez legalább 10 egészséges bőrű állatot (öt hímet és öt nőstényt) kell felhasználni. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Ha időközi elpusztítást terveznek, akkor a létszámot annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el szándékoznak pusztítani. Ezenkívül még egy 10 fős (nemenként öt állat) kísérő állatcsoportot is kezelhetnek a legnagyobb adaggal 28 napon át a toxikus hatás visszafordíthatóságának, elhúzódó vagy késve fellépő voltának megfigyelésére 14 nappal a kezelés után. 10 kontrollállatból (nemenként öt állat) álló kísérő csoportot is használni kell.

1.6.2.3. *Dózisok*

Legalább három dózist és egy kontrollt kell használni, illetve egy vivőanyag-kontrollt, ha van vivőanyag. Az expozíciós idő legalább napi hat óra legyen. A vizsgált anyagot minden nap hasonló időpontban kell alkalmazni, az alkalmazott mennyiséget pedig meghatározott időközönként (hetente vagy hetente kétszer) hozzá kell igazítani az állatok növekedéséhez, hogy az állatok testsúlyához viszonyított mennyiséget fenn lehessen tartani. A vizsgált anyaggal történő kezelést kivéve a kontrollcsoportban lévő állatokkal pontosan ugyanolyan módon kell bánni, mint a vizsgálati csoportok állataival. Olyan esetekben, amikor az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot alkalmaznak, a kontrollcsoportot ugyanúgy kell a vivőanyaggal kezelni, mint a kezelt csoportokat, és ugyanannyi vivőanyagot kell kapniuk, mint a legnagyobb adaggal kezelt csoportnak. A legnagyobb dózist úgy kell kiválasztani, hogy annak hatására az azzal kezelt csoportban jelentkezzenek a toxicitás jelei, de elhullás lehetőleg ne, vagy csak minimális mértékben jelentkezzen. A legkisebb adagot úgy kell kiválasztani, hogy az ne okozzon toxikus tüneteket. Ha használható becslés áll rendelkezésre az emberi expozícióra vonatkozóan, a legkisebb adagnak ennél nagyobbnak kell lennie. Kedvező esetben a középső adaggal kezelt csoportnál minimális toxikus hatás észlelhető. Ha egynél több közbeeső dózist alkalmaznak, akkor azokat úgy kell kiválasztani, hogy fokozódó toxikus hatást váltsanak ki. Az alacsony és közbeeső dózissal kezelt csopotokban, illetve a kontrollcsoportban az elpusztult állatok száma minimális legyen, hogy az eredmények értelmezhető értékelése lehetséges legyen.

Ha a vizsgált anyag alkalmazása súlyos bőrirritációt okoz, a koncentrációt csökkenteni kell, ami az egyéb toxikus hatások mértékének csökkenésével vagy eltűnésével járhat a legnagyobb adaggal kezelt csoportban. Ha a bőr súlyosan károsodott, szükségessé válhat a vizsgálat leállítása és egy új vizsgálat megkezdése kisebb koncentrációk mellett.

1.6.2.4. *Határérték-vizsgálat*

Ha az előzetes vizsgálat során napi 1 000 mg/testsúlykilogrammal adagolt vizsgált anyag vagy – ha a lehetséges emberi expozíció mértéke ismert – ennél magasabb dózis semmilyen toxikus hatást nem vált ki, a további vizsgálatok szükségtelennek tekinthetők.

1.6.2.5. *Megfigyelési időszak*

Az összes állatot meg kell vizsgálni naponta a toxikus hatások megjelenésének észlelése érdekében. Fel kell jegyezni az elpusztulás időpontját, valamint azt az időpontot, amikor a toxikus hatás jelei mutatkozni kezdenek, illetve elmúlnak.

▼B

1.6.3. **A kísérlet végrehajtása**

Az állatokat egyesével kell a ketrecekben elhelyezni. Ideális esetben a vizsgált anyagot heti hét alkalommal kell az állatoknak beadni, 28 napon keresztül. A kísérő csoportokban a nyomon követő megfigyelésekre kiválasztott állatokat további 14 napig kell tartani kezelés nélkül, hogy a toxikus hatás visszafordíthatóságát, illetve elhúzódását ki lehessen mutatni. Az expozíció időtartama napi hat óra.

A vizsgált anyagot a testfelület megközelítőleg 10 %-át kitevő felületen egyenletesen elosztva kell felvinni az állat bőrére. Erősen mérgező anyagoknál a felület lehet ennél kisebb, de a felület lehető legnagyobb részét a lehető legvékonyabb és legegyenletesebb bevonattal kell ellátni.

Az expozíció ideje alatt a vizsgált anyagot a bőrrel porózus gézkötéssel és nem irritáló ragtapasszal kell érintkezésben tartani. A vizsgált területet megfelelő módon be kell fedni, azért, hogy megmaradjon rajta a vizsgált anyag és a gézkötés, és az állatok ne nyalhassák le a vizsgált anyagot. Mozgásgátló szerkezeteket lehet használni annak megakadályozására, hogy az állat a vizsgált anyagot lenyelje, de a teljes immobilizáció mint módszer nem javasolt. Alternatív megoldás lehet az ún. nyakörv védelmi eszköz használata.

Az expozíciós idő leteltével a maradék vizsgált anyagot lehetőség szerint el kell távolítani a bőr felületének vízzel vagy más megfelelő módon történő megtisztítása útján.

Az összes állatot meg kell vizsgálni naponta, és a toxikus hatások megjelenését, súlyosságát és időtartamát rögzíteni kell. A megfigyelésnek ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártya, valamint a légző-, keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszer, valamint a szomatomotoros tevékenység és viselkedési minta változásaira. Hetente mérni kell az állatok súlyát. Ajánlott a takarmányfogyasztást is hetente mérni. Az állatok rendszeres megfigyelésére azért van szükség, hogy megelőzzük a kísérleti állatok kannibalizmus, szöveti autolízis, illetve rossz elhelyezés következtében történő elhullását. A vizsgálati időszak végeztével a kísérő csoportban lévő állatok kivételével minden túlélő állatot fel kell boncolni. A súlyos és tartós betegség, illetve fájdalom jeleit mutató állatokat el kell távolítani, kíméletes módon leölni, és felboncolni.

A következő vizsgálatokat kell végrehajtani a vizsgálat végén minden állaton, a kontrollállatokat is ideértve:

1) vérkép, amely magában foglalja legalább a hematokrit-értéket, a hemoglobin-koncentrációt, a vörösvértestszámot, a teljes és a fehérvérsejtszámot, a minőségi vérképet, az alvadási képességet, beleértve az alvadási időt;

2) a vér klinikai-kémiai vizsgálata, amely magában foglalja a máj- és vesefunkció legalább egy paraméterét: szérum alanin-aminotranszferáz (korábban glutamát-piruvát- transzaminázként volt ismert), szérum aszpartát-aminotranszferáz (korábban glutamát- oxálecetsav-transzaminázként volt ismert), karbamid-nitrogén, az albumin, a kreatinin, az össz-bilirubin és szérum összfehérjeszintjének mérését.

További meghatározások, amelyekre a pontos toxicitás értékeléséhez még szükség lehet: kalcium-, foszfor-, klorid-, nátrium-, káliumszint, éhgyomorra mért glükózszint, lipidek, hormonok, sav-bázis egyensúly, methemoglobin és a kolineszterázaktivitás.

▼B

Ahol a megfigyelt hatások vizsgálatának kiterjesztéséhez szükséges, további klinikai-kémiai vizsgálatokat is lehet végezni.

1.6.4. **Autopszia**

A vizsgálatban részt vett minden állatot teljes boncolásnak kell alávetni. A májat, a veséket, a mellékveséket és a heréket a kimetszés után minél előbb, még nedvesen le kell mérni a kiszáradás elkerülése miatt. A szerveket és szöveteket (máj, vese, lép, herék, mellékvesék, szív és minden jelentős sérülést vagy méretváltozást mutató szerv) alkalmas közegben fixálni kell az esetleges jövőbeni kórszövettani vizsgálathoz.

1.6.5. **Kórszövettani vizsgálat**

A nagy adaggal kezelt csoportban és a kontrollcsoportban szövettani vizsgálatot kell végrehajtani a tartósított szerveken és szöveteken. Azon szerveket és szöveteket, amelyek a legnagyobb dózisnál vizsgált anyagnak tulajdonítható károsodásokat mutatnak, minden alacsonyabb dózissal kezelt csoportban meg kell vizsgálni. Minden, a kísérő csoportba tartozó állatnál szövettani vizsgálatot kell végezni, külön hangsúlyt helyezve azon szervekre és szövetekre, amelyekről megállapítást nyert, hogy más kezelt csoportokban toxikus hatásokat mutatnak.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, minden egyes vizsgált csoporthoz megadva az állatok számát a vizsgálat kezdetén és az egyes sérüléstípusokat mutató állatok számát.

Minden megfigyelt eredményt megfelelő statisztikai módszerrel ki kell értékelni. Bármilyen elismert statisztikai módszer használható.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— a használt fajt, törzset, az állatok származását, a tartási körülményeket, az étrendet,

— a vizsgálati körülményeket (ideértve a kötszer típusát is: zárt vagy nem zárt),

— az adagolást (beleértve a vivőanyagot is, ha van) és a koncentrációkat,

— azt a szintet, amikor még nincs toxikus hatás (NEL),

— toxikus reakcióra vonatkozó adatokat, nemek és adagolás szerinti csoportosításban,

— az elpusztulás idejét a vizsgálat során, illetve hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét,

— a toxikus és más hatások leírását,

— az egyes toxikus tünetek megfigyelésének időpontját és a megfigyelést követő változásukat,

— a takarmány fogyasztásával és a testsúly változásával kapcsolatos adatokat,

— az elvégzett hematológiai vizsgálatokat és azok valamennyi eredményét,

▼B

— az elvégzett klinikai-kémiai vizsgálatokat és azok valamennyi eredményét (beleértve az esetleges vizeletelemzés eredményeit is),

— a boncolási leleteket,

— a kórszövettani vizsgálatok eredményének részletes ismertetését,

— az eredmények statisztikai feldolgozását, ahol lehetséges,

— az eredmények megvitatását,

— az eredmények értelmezését.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. **SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

▼M7

B.10. **KROMOSZÓMA-RENDELLENESSÉGEK *IN VITRO* VIZSGÁLATA EMLŐSÖKÖN**

BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 473. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. E vizsgálati módszer a genetikai toxikológiai vizsgálati módszerek sorozatának részét képezi. Kidolgozásra került egy, a genetikai toxikológiai vizsgálatokról tömör tájékoztatást nyújtó, a vizsgálati iránymutatások közelmúltbeli változásait áttekintő OECD-dokumentum (1).

A kromoszóma-rendellenességek *in vitro* vizsgálatának célja a tenyésztett emlősállatsejtekben szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket okozó vegyi anyagok azonosítása (2) (3) (4). A szerkezeti rendellenességek kétféle típusúak lehetnek: kromoszóma vagy kromatid típusú rendellenességek. Poliploidia (többek között endoreduplikáció) felléphet a kromoszóma-rendellenességek *in vitro* vizsgálata során. Míg az aneugének kiválthatnak poliploidiát, a poliploidia önmagában nem jelez aneugén potenciált, egyszerűen sejtcikluszavarra vagy citotoxicitásra (5) utalhat. E vizsgálatnak nem az aneuploidia mérése a célja. Az aneuploidia kimutatására *in vitro* mikronukleusz-vizsgálat (6) lenne ajánlott.

A kromoszóma-rendellenesség *in vitro* vizsgálata során emberek vagy rágcsálók megállapodott sejtvonalaiból származó tenyészetek vagy primer sejtkultúrák alkalmazhatók. A felhasznált sejteket a tenyészetben való növekedési képesség, a kariotípus stabilitása (többek között a kromoszómaszám) és a kromoszóma-rendellenességek spontán gyakorisága alapján kell kiválasztani (7). A rendelkezésre álló adatok jelenleg nem teszik lehetővé határozott ajánlások megfogalmazását, azonban arra utalnak, hogy a kémiai veszélyek értékelése során fontos figyelembe venni a vizsgálat céljára kiválasztott sejtek p53 státuszát, genetikai (kariotípus-) stabilitását, DNS-reparációs képességét és eredetét (rágcsáló-, illetve emberi sejtek). E vizsgálati módszer alkalmazóinak tehát érdemes figyelembe venniük a sejtek szóban forgó és egyéb tulajdonságainak a sejtvonalak teljesítményére kifejtett hatását a kromoszóma-rendellenességek indukálásának kimutatása során, mivel a tudomány fejlődik ezen a területen.

A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

Az *in vitro* végrehajtott vizsgálatok rendszerint szükségessé teszik a metabolikus aktiválás valamilyen exogén forrásának használatát, kivéve, ha a sejtek metabolizálják a vizsgálati vegyi anyagokat. Az exogén metabolikus aktivációs rendszer nem utánozza teljes egészében az *in vivo* körülményeket. Ügyelni kell arra, hogy ne álljanak elő olyan körülmények, amelyek hamis pozitív eredményekhez – például nem a vizsgálati vegyi anyagok és a kromoszómák közvetlen kölcsönhatása okozta kromoszóma-károsodáshoz – vezethetnek; ilyen körülmény többek között a pH-érték vagy az ozmolalitás változása (8) (9) (10), a közeg összetevőivel való kölcsönhatás (11) (12) vagy a túlzott mértékű citotoxicitás (13) (14) (15) (16).

Ez a vizsgálati módszer azon kromoszóma-rendellenességek kimutatására használatos, amelyek klasztogén hatásokból fakadhatnak. A kromoszóma-rendellenességek indukálását metafázisban lévő sejtek segítségével kell elemezni. Így elengedhetetlen, hogy a sejtek a kezelt és a nem kezelt tenyészetekben is elérjék a mitózist. A mesterséges nanoanyagok esetében e vizsgálati módszer egyedi adaptálására lehet szükség, amelyet azonban ez a vizsgálati módszer nem ismertet.

A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

▼M7

A VIZSGÁLAT ELVE

Az emberből vagy más emlősből származó sejttenyészeteket exogén metabolikus aktiválási forrással vagy anélkül is kezelni kell a vizsgálati vegyi anyaggal, kivéve megfelelő metabolizáló képességű sejtek használata esetén (lásd a 13. pontot). A sejttenyészetek vizsgálati vegyi anyagnak való expozíciója megkezdését követően a sejteket megfelelő, előre meghatározott időközönként metafázis-blokkoló szerrel (például kolcemiddel vagy kolchicinnel) kell kezelni, majd az összegyűjtött, megfestett és metafázisban lévő sejteket mikroszkóp segítségével elemezni kell a kromatid típusú és kromoszóma típusú rendellenesség vizsgálata érdekében.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Sejtek

Különféle sejtvonalak (például kínaihörcsög-petefészek CHO), kínaihörcsögtüdő V79-es sejtvonal, kínaihörcsögtüdő (CHL)/IU, TK6-os sejtvonal) vagy primer sejtkultúrák, többek között ember vagy más emlős perifériás limfocitái használhatók (7). A használt sejtvonalaknak tudományosan indokoltnak kell lenniük. Primer sejtek használatakor állatjóléti okok miatt meg kell fontolni emberi eredetű primer sejtek használatát – amennyiben megvalósítható –, és azokból a humán etikai elveknek és a vonatkozó szabályozásoknak megfelelően kell mintát venni. Az emberi perifériás limfocitákat olyan fiatal (kb. 18–35 éves), nem dohányzó egyénektől kell venni, akik ismert betegséggel nem rendelkeznek, illetve a közelmúltban genotoxikus szereknek (például vegyi anyagoknak, ionizáló sugárzásnak) nem voltak kitéve olyan mértékben, amely fokozná a kromoszóma-rendellenességek háttérbeli előfordulását. Ez biztosítaná, hogy a kromoszóma-rendellenességek háttérbeli előfordulása alacsony és egységes legyen. A kromoszóma-rendellenességek alapesetbeli előfordulása az életkor előrehaladtával nő, és ez a tendencia a nőknél jellemzőbb, mint a férfiaknál (17) (18). Amennyiben több donortól származó sejteket együtt használnak fel, akkor a donorok számát meg kell adni. Igazolni kell, hogy a sejtek a vizsgálati vegyi anyaggal való kezelés kezdetétől a sejtekből történő mintavételig osztódtak. A sejttenyészeteket exponenciális sejtnövekedési fázisban (sejtvonalakban) kell tartani vagy osztódásra kell késztetni (primer limfocita-tenyészetek) a sejteknek a sejtciklus különböző szakaszaiban történő expozíciója érdekében, mivel a sejtfázisoknak a vizsgálati vegyi anyagokra való érzékenysége nem feltétlenül lehet ismert. Azok a primer sejtek, amelyeket az osztódás érdekében mitogén szerekkel kell stimulálni, a vizsgálati vegyi anyagnak való expozíció során általában már nem szinkronizáltak (például az emberi limfociták 48 órás mitogén stimulációt követően). Szinkronizált sejtek használata nem javasolt a kezelés során, indokolt esetben azonban elfogadható.

Tenyészközegek és tenyésztési körülmények

A tenyészetek fenntartására megfelelő tenyészközeget és inkubációs feltételeket (tenyésztőedények, megfelelő esetben 5 %-os CO_2-koncentrációjú párás légkör, 37 °C-os inkubációs hőmérséklet) kell alkalmazni. A sejtvonalakat rutinszerűen ellenőrizni kell a modális kromoszómaszám stabilitása és a mikoplazma-fertőzés hiánya szempontjából (7) (19), és a sejtek nem használhatók fel, ha fertőzöttek, vagy ha a modális kromoszómaszám megváltozott. A vizsgálólaboratóriumban használt sejtvonalak, illetve primer sejtkultúrák rendes sejtciklusidejét meg kell állapítani, és annak összhangban kell lennie a közzétett sejtjellemzőkkel (20).

A tenyészetek előkészítése

Sejtvonalak: a sejteket törzstenyészetekből fel kell szaporítani, majd tenyészközegbe kell leoltani olyan sejtszámmal, hogy a sejtek a szuszpenziókban vagy a monolayer tenyészetekben továbbra is exponenciálisan növekedjenek a begyűjtés idejéig (a monolayer tenyészetekben növő sejtek esetében például kerülendő a konfluencia).

▼M7

Limfociták: alvadásgátlóval (például heparinnal) kezelt teljes vért vagy szeparált limfocitákat kell tenyészteni (például emberi limfociták esetében 48 óráig) mitogén szer [emberi limfociták esetében például phytohaemagglutinin (PHA)] jelenlétében, annak érdekében, hogy a vizsgálati vegyi anyagnak való expozíció előtt sejtosztódást váltsanak ki.

Metabolikus aktiválás

A nem megfelelő endogén metabolikus képességű sejtek használata esetén exogén metabolikus aktivációs rendszereket kell alkalmazni. Amennyiben az ettől való eltérés nem indokolt, az alapértelmezetten ajánlott, legáltalánosabban használt rendszer a rágcsálók (általában patkányok) enziminduktorral (ilyen például az Aroclor 1254 (21) (22) (23) vagy fenobarbitál és ß-naftoflavon kombinációjával (24) (25) (26) (27) (28) (29)) kezelt májából preparált, kofaktor-kiegészítésű posztmitokondriális frakció (S9). Ez utóbbi kombináció nem ütközik a környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokról szóló stockholmi egyezménnyel (30), és kiderült róla, hogy olyan hatékony, mint az Aroclor 1254 a vegyes funkciójú oxidáz indukálásához (24) (25) (26) (28). Az S9 frakció jellemzően 1–2 térfogatszázalék koncentrációban használatos, de a végső vizsgálati közegben 10 térfogatszázalékra növelhető. A mitotikus indexet csökkentő termékek, különösen a kalcium-komplexáló termékek (31) használata kerülendő a kezelés során. Az alkalmazott exogén metabolikus aktivációs rendszer vagy metabolikus induktor típusának és koncentrációjának megválasztását befolyásolhatja a vizsgált anyagok osztálya.

A vizsgálati vegyi anyag előkészítése

A szilárd halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagokat a sejtek kezelése előtt megfelelő oldószerben elő kell készíteni, és szükség esetén hígítani kell (lásd a 23. pontot). A folyékony halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagok közvetlenül hozzáadhatók a vizsgálati rendszerhez és/vagy hígíthatók a vizsgálati rendszer kezelése előtt. A gáz halmazállapotú vagy illékony vizsgálati vegyi anyagokat a standard protokollok megfelelő módosításával, például légmentesen lezárt tenyésztőedényekben történő kezeléssel kell vizsgálni (32) (33) (34). A vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó készítményeket pontosan a kezelés előtt kell előállítani, kivéve, ha a stabilitásra vonatkozó adatok a tárolás elfogadhatóságát bizonyítják.

Vizsgálati körülmények

Oldószerek

Az oldószert oly módon kell kiválasztani, hogy optimalizálja a vegyi anyag oldhatóságát, ugyanakkor ne befolyásolja hátrányosan a vizsgálat lebonyolítását, vagyis ne változtassa meg a sejtek növekedését, ne érintse a vizsgálati vegyi anyag integritását, ne lépjen reakcióba a tenyésztőedényekkel, és ne károsítsa a metabolikus aktivációs rendszert. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer (vagy tenyészközeg) használatát érdemes megfontolni. Jól bevált oldószer például a víz vagy a dimetil-szulfoxid. A végleges kezelési közegben a szerves oldószerek általában nem haladhatják meg az 1 térfogatszázalékot, a vizes oldószerek (sós lé vagy víz) pedig a 10 térfogatszázalékot. Ha nem jól bevált szerves oldószereket (például etanolt vagy acetont) használnak, a használatukat a vizsgálati vegyi anyaggal és a vizsgálati rendszerrel való összeegyeztethetőségükre utaló, valamint azt jelző adatokkal kell alátámasztani, hogy a használt koncentrációnál nem genotoxikusak. Alátámasztó adatok hiányában fontos nem kezelt kontrollok (lásd az 1. függeléket) alkalmazása annak bizonyítására, hogy a kiválasztott oldószer nem vált ki ártalmas vagy klasztogén hatást.

A sejtproliferáció és a citotoxicitás mérése, valamint a kezelési koncentrációk kiválasztása

A vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációjának meghatározása során kerülendő az olyan koncentráció, amely hamis pozitív válaszreakciókat válthat ki, ilyen a túlzott citotoxicitást okozó koncentráció (lásd a 22. pontot), a tenyésztőközegben való kicsapódást okozó koncentráció (lásd a 23. pontot), illetve a pH vagy az ozmolalitás jelentős változását okozó koncentráció (lásd az 5. pontot). Ha a vizsgálati vegyi anyag a hozzáadásakor jelentős változást okoz a tenyészközeg pH-jában, a pH a kezelésre szolgáló végleges tenyészközeg pufferelésével

▼M7

kiigazítható, hogy elkerülhetők legyenek a hamis pozitív eredmények és megfelelő tenyésztési feltételeket lehessen fenntartani.

Mérni kell a sejtproliferációt annak biztosítása érdekében, hogy a vizsgálat során elegendő számú kezelt sejt elérje a mitózist, és hogy a kezelésekre megfelelő szintű citotoxicitás mellett kerüljön sor (lásd a 18. és a 22. pontot). A citotoxicitást a fő kísérletben metabolikus aktiválással és anélkül is meg kell határozni a sejtelhalás és a sejtnövekedés megfelelő mutatóinak használatával. Bár egy kiindulási vizsgálat során hasznos lehet a citotoxicitás értékelése a fő kísérletben alkalmazandó koncentrációk jobb meghatározásához, a kiindulási vizsgálat nem kötelező. Végrehajtása esetén nem helyettesítheti a citotoxicitás fő kísérlet során történő mérését.

A relatív populációduplázódás (RPD) vagy a sejtszám relatív növekedése (RICC) megfelelő módszer a citotoxicitás citogenetikai vizsgálatok során történő értékelésére (13) (15) (35) (36) (55) (a képletekért lásd a 2. függeléket). Hosszú távú kezelés és a kezelés kezdetétől számított 1,5 normál sejtciklusidőn túli mintavétel esetén (azaz összesen 3 sejtciklusidőnél hosszabb idő elteltével) az RPD alulbecsülheti a citotoxicitást (37). Ilyen körülmények között az RICC jobb mértékegység lehet, illetve a citotoxicitás 1,5 normál sejtciklusidő utáni, RPD alkalmazásával történő értékelése hasznos becslést ad.

Ami a primer sejtkultúrákban lévő limfocitákat illeti, bár a mitotikus index (MI) a citotoxikus /citosztatikus hatások mérésére szolgál, azt befolyásolja, hogy a kezelés után mikor mérik, továbbá a használt mitogén és a sejtciklus esetleges megszakadása. Az MI azonban azért elfogadható, mert a citotoxicitás egyéb mérése nehézkes és kivitelezhetetlen lehet, és nem feltétlenül vonatkozik a PHA-stimulációra válaszreakcióként szaporodó limfociták célpopulációjára.

Bár a sejtvonalak esetében az RPD és az RICC, valamint a primer limfocita-tenyészet esetében az MI az ajánlott citotoxicitási paraméter, más mutatók (például a sejtintegritás, az apoptózis, a nekrózis, a sejtciklus) további hasznos információval szolgálhatnak.

Az elfogadhatósági kritériumokat (megfelelő citotoxicitás, sejtszám stb.) teljesítő, (az oldószeres és a pozitív kontrollokat nem tartalmazó) legalább három vizsgálati koncentrációt kell értékelni. A sejtek típusától (limfocita-sejtvonalak vagy primer limfocita-tenyészetek) függetlenül, minden egyes vizsgált koncentrációnál párhuzamos vagy szimpla kezelt tenyészetek használhatók. Bár két párhuzamos tenyészet használata ajánlatos, a szimpla tenyészetek is elfogadhatóak, amennyiben a szimpla vagy a párhuzamos tenyészetek esetében megegyezik az összességében értékelt sejtek száma. A szimpla tenyészetek használata különösen releváns, ha több mint három koncentráció értékelésére kerül sor (lásd a 31. pontot). A független párhuzamos tenyészetekben adott koncentráció mellett kapott eredmények összevonhatók az adatelemzéshez (38). Az alacsony citotoxicitást vagy a citotoxicitás hiányát mutató vizsgálati vegyi anyagok esetében rendszerint megközelítőleg kétszeres-háromszoros koncentrációs intervallumok helyénvalóak. Citotoxicitás fellépése esetén a vizsgálati koncentrációknak le kell fedniük a 22. pontban ismertetett, citotoxicitást okozó koncentrációtól azokig a koncentrációkig terjedő tartományt, ahol mérsékelt vagy alacsony a citotoxicitás, illetve nem jelentkezik citotoxicitás. Számos vizsgálati vegyi anyagnak meredek a koncentráció-válasz görbéje, és annak érdekében, hogy alacsony és mérsékelt

▼M7

citotoxicitásnál adatokat lehessen nyerni, vagy részletesen meg lehessen vizsgálni a dózis-válasz összefüggést, egymáshoz közelebbi koncentrációkat és/vagy háromnál több koncentrációt (szimpla tenyészeteket vagy párhuzamos tenyészeteket) kell használni, különösen olyan helyzetekben, ahol megismételt kísérlet szükséges (lásd a 47. pontot).

Ha a legmagasabb koncentráció a citotoxicitáson alapul, a legmagasabb koncentrációval 55 ± 5 %-os citotoxicitást kell megcélozni a citotoxicitás ajánlott paramétereinek alkalmazásával (azaz a sejtvonalak RICC és RPD mutatójának, illetve a primer limfocita-tenyészetek esetében az MI mutatónak a párhuzamos negatív kontroll 45 ± 5 %-ára csökkenésével). Az 55 ± 5 %-os citotoxicitási tartománynak csak a magasabb részén megtalálható pozitív eredmények értelmezése során körültekintően kell eljárni (13).

A legalacsonyabb oldhatatlan koncentrációnál alacsonyabb koncentrációk mellett nem citotoxikus, kevéssé oldható vegyi anyagok esetében a legmagasabb analizált koncentrációnak a vizsgálati vegyi anyaggal történő kezelés végén szemmel vagy inverz mikroszkóp segítségével látható zavarosságot vagy kicsapódást kell okoznia. Még abban az esetben is, ha citotoxicitás a legalacsonyabb oldhatatlan koncentráció felett jön létre, ajánlatos egyetlen egy, zavarosságot vagy látható kicsapódást okozó koncentrációt vizsgálni, mivel a kicsapódás fals hatásokat eredményezhet. A kicsapódást okozó koncentrációnál ügyelni kell annak biztosítására, hogy a kicsapódás ne zavarja a vizsgálat lebonyolítását (például a megfestést vagy az értékelést). Hasznos lehet a tenyészközegben való oldhatóság meghatározása a kísérlet előtt.

Ha nem figyelhető meg kicsapódás vagy korlátozó citotoxicitás, a legmagasabb vizsgálati koncentrációnak 10 mM-nek, 2 mg/ml-nek vagy 2 µl/ml-nek kell megfelelnie, melyek közül a legalacsonyabb a mérvadó (39) (40) (41). Ha a vizsgálati vegyi anyag nem meghatározott összetételű, például ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyag (UVCB) (42), környezeti extraktum stb., előfordulhat, hogy kellő citotoxicitás hiányában a legmagasabb koncentrációnak magasabbnak (például 5 mg/ml-nek) kell lennie ahhoz, hogy növekedjen az egyes összetevők koncentrációja. Megjegyzendő azonban, hogy ezek a követelmények eltérőek lehetnek a humán gyógyszerek esetében (43).

Kontrollok

Minden begyűjtés alkalmával párhuzamos negatív kontrollokat kell használni (lásd a 15. pontot), amelyeknél csak oldószert alkalmaznak a kezelt közegben, és a kezelésük ugyanolyan módon történik, mint a kezelt tenyészeteké.

Párhuzamos pozitív kontrollok szükségesek annak igazolására, hogy a laboratórium képes az alkalmazott vizsgálati protokoll feltételei mellett klasztogének azonosítására, valamint adott esetben az exogén metabolikus aktivációs rendszer eredményességének igazolása érdekében. Pozitív kontrollokra vonatkozó példák az alábbi 1. táblázatban találhatók. Indokolt esetben pozitív kontrollként alternatív vegyi anyagok használhatók. Mivel az emlőssejtek genetikai toxicitás szempontjából végzett *in vitro* vizsgálatai kellően szabványosítottak, a pozitív kontrollok használata a metabolikus aktiválást igénylő klasztogénekre korlátozódhat. Amennyiben erre a nem aktivált vizsgálattal egyidejűleg, azonos időtartamú kezelés mellett kerül sor, ezen egyetlen pozitív kontroll válaszreakciója a metabolikus aktivációs rendszer aktivitását és a vizsgálati rendszer reagálóképességét is bizonyítani fogja. A(z S9 nélküli) hosszú távú kezelésnek azonban kell, hogy legyen saját pozitív kontrollja, mivel a kezelés időtartama eltér a metabolikus aktiválás alkalmazása mellett végzett vizsgálatétól. Mindegyik pozitív kontrollt egy vagy több olyan koncentrációban kell alkalmazni, amely a háttérértékekben reprodukálható és kimutatható növekedést okoz, hogy bizonyítani lehessen a vizsgálati rendszer érzékenységét (azaz a hatások egyértelműek, de az értékelést végző személy nem tudja beazonosítani azonnal a kódolt tárgylemezt), és a választ nem veszélyeztetheti a vizsgálati módszerben meghatározott határértékeket meghaladó citotoxicitás.

▼M7

1. táblázat

A laboratóriumok jártasságának értékeléséhez és a pozitív kontrollok kiválasztásához ajánlott referenciaanyagok.

Kategória	Vegyi anyag	CASRN
1. Metabolikus aktiválás nélkül is aktív klasztogének		
	Metil-metánszulfonát	66-27-3
	Mitomicin-C	50-07-7
	4-Nitro-kinolin-N-oxid	56-57-5
	Citozin-arabinozid	147-94-4
2. Metabolikus aktiválást igénylő klasztogének		
	Benzo(a)pirén	50-32-8
	Ciklofoszfamid	50-18-0

ELJÁRÁS

Kezelés a vizsgálati vegyi anyaggal

A proliferáló sejteket metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és hiányában kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal.

Tenyészetbegyűjtési idő

A negatív eredmény megállapításához szükséges alapos értékeléshez mindhárom alábbi kísérleti körülményt meg kell teremteni, metabolikus aktiválással és anélkül végzett rövid távú kezeléssel, valamint metabolikus aktiválás nélküli hosszú távú kezeléssel (lásd a 43., 44. és 45. pontot):

— a sejteket metabolikus aktiválás nélkül 3–6 órára ki kell tenni a vizsgálati vegyi anyag hatásának, és azokból a kezelés megkezdése után kb. 1,5 normál sejtciklusidőnek megfelelő időpontban mintát kell venni (18),

— a sejteket metabolikus aktiválással 3–6 órára ki kell tenni a vizsgálati vegyi anyag hatásának, és azokból a kezelés megkezdése után kb. 1,5 normál sejtciklusidőnek megfelelő időpontban mintát kell venni (18),

— a sejteket a kezelés megkezdése után kb. 1,5 normál sejtciklusidőnek megfelelő időpontban történő mintavételig metabolikus aktiválás nélkül folyamatosan ki kell tenni a vizsgálati vegyi anyagnak. Előfordulhat, hogy bizonyos vegyi anyagok (például a nukleozidanalógok) könnyebben észlelhetők 1,5 normál sejtciklusidőnél hosszabb kezelési/mintavételi idő alkalmazása esetén (24).

Abban az esetben, ha a fenti kísérleti körülmények pozitív válaszreakciót eredményeznek, a többi kezelési eljárás vizsgálata nem feltétlenül szükséges.

Kromoszómapreparálás

A sejttenyészeteket a begyűjtésük előtt rendszerint 1–3 órán át kolcemiddel vagy kolchicinnel kell kezelni. Minden sejttenyészetet külön kell begyűjteni és feldolgozni a kromoszómapreparátumok készítéséhez. A kromoszómapreparátumok készítése a sejtek hipotóniás kezelését, fixálását és megfestését foglalja magában. A monolayer tenyészetekben a 3–6 órás kezelés végén mitotikus sejtek (ismertetőjegyük, hogy alakjuk kerek, és leválnak a felszínről) lehetnek jelen. Mivel

▼M7

ezek a mitotikus sejtek könnyen leválnak, a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó közeg eltávolításakor elveszhetnek. Ha bizonyíték van arra, hogy a mitotikus sejtek száma a kontrollokéhoz képest jelentősen megnő, valószínűsíthető mitotikus leállást jelezve, a sejteket centrifugálással be kell gyűjteni és vissza kell tenni a tenyészetekbe, annak elkerülése érdekében, hogy a begyűjtéskor elveszszenek a mitózisban lévő sejtek, valamint azok a sejtek, amelyeknél kromoszóma-rendellenesség kockázata áll fenn.

Elemzés

A kromoszóma-rendellenességek vizsgálatára irányuló mikroszkópos elemzés előtt minden tárgylemezt, a pozitív és negatív kontrollokét is ideértve, önálló kódolással kell ellátni. Mivel gyakori, hogy a fixálási eljárások bizonyos arányban olyan metafázisban lévő sejteket eredményeznek, amelyek kromoszómkat veszítettek, ezért az értékelt sejteknek a modális kromoszómaszám ± 2-vel egyenlő számú centromérát kell tartalmazniuk.

Koncentrációnként legalább 300, jól szétterült metafázist kell értékelni és ellenőrizni annak megállapításához, hogy valamely vizsgálati vegyo anyag egyértelműen negatív (lásd a 45. pontot). Párhuzamos tenyészetek használata esetén a 300 sejtet egyenlő mértékben kell elosztani a párhuzamosok között. Koncentrációnként egy tenyészet alkalmazása esetén (lásd a 21. pontot) legalább 300, jól szétterült metafázist kell értékelni ebben az egy tenyészetben. 300 sejt értékelésének az az előnye, hogy fokozza a vizsgálat statisztikai erejét, és ráadásul a nulla értékek megfigyelése ritkán (várhatóan mindössze 5 %-os gyakorisággal) fog előfordulni (44). Az értékelt metafázisok száma csökkenthető, ha sok kromoszóma-rendellenességgel rendelkező sejt figyelhető meg és a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül.

Az egy vagy több szerkezeti kromoszóma-rendellenességgel rendelkező sejteket a gapek figyelembevételével és figyelmen kívül hagyásával is értékelni kell. A törések és a gapek (45), (46) irodalom szerinti fogalommeghatározása az 1. függelékben található. A kromatid és a kromoszóma típusú rendellenességeket különkülön kell feljegyezni és altípusonként (törések, kicserélődések) kell besorolni. A laboratóriumban alkalmazott eljárásoknak biztosítaniuk kell, hogy a kromoszóma-rendellenességeket jól képzett értékelők elemezzék, és adott esetben szakértők értékeljék.

Bár a vizsgálat célja a szerkezeti kromoszóma-rendellenességek kimutatása, fontos a poliploidia és az endoreduplikáció gyakoriságának feljegyzése, amennyiben ezek láthatók (lásd a (2) pontot).

A laboratórium jártassága

A laboratóriumoknak a vizsgálat rutinszerű alkalmazása előtti elegendő tapasztalat igazolása érdekében kísérletsorozatot kell végrehajtaniuk referenciaként szolgáló, más-más mechanizmusú pozitív vegyi anyagokkal, továbbá (különböző oldószerek/vivőanyagok segítségével) különféle negatív kontrollokkal. E pozitív és negatív kontrollok válaszreakcióinak összhangban kell lenniük a szakirodalommal. Ez nem vonatkozik azokra a laboratóriumokra, amelyek tapasztalattal rendelkeznek, azaz amelyeknek a rendelkezésére áll a 37. pontban meghatározott történeti adatbázis.

A pozitív kontrollként szolgáló, kiválasztott vegyi anyagokat (lásd a 26. pont 1. táblázatát) metabolikus aktiválás nélkül végzett rövid és hosszú kezeléssel, továbbá metabolikus aktiválás jelenlétében végzett rövid kezeléssel is meg kell vizsgálni a laboratórium klasztogén hatású vegyi anyagok kimutatásában, valamint a metabolikus aktiváló rendszer eredményességének meghatározásában való jártasságának bizonyítása érdekében. A vizsgálati rendszer érzékenységének és dinamikus tartományának bizonyítása érdekében a kiválasztott vegyi anyagok koncentrációtartományát úgy kell megválasztani, hogy reprodukálható és koncentrációval összefüggő növekedést biztosítson a háttérértékekhez viszonyítva.

▼M7

Történeti kontrolladatok

A laboratóriumnak meg kell állapítania a következőket:

— a pozitív kontrollok történeti tartománya és eloszlása,

— a negatív (nem kezelt, oldószeres) kontrollok történeti tartománya és eloszlása.

A negatív kontrollok történeti eloszlásához kapcsolódó első adatgyűjtés során a párhuzamos negatív kontrolloknak összhangban kell lenniük a kontrollokra vonatkozóan közzétett adatokkal, amennyiben léteznek. Amint több kísérleti adat adódik a kontrollok eloszlásához, a párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben az eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük (44) (47). A laboratórium negatív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisát első lépésként legalább 10 kísérlettel kell kiépíteni, de az adatbázisnak lehetőség szerint legalább 20, összehasonlítható kísérleti körülmények között végzett kísérletet kell tartalmaznia. A laboratóriumoknak minőségellenőrzési módszereket, például ellenőrzési diagramokat (C-diagramokat vagy X-bar diagramokat (48)) kell alkalmazniuk annak meghatározására, hogy a pozitív és a negatív kontrollokra vonatkozó adataik mennyire változóak, valamint annak bizonyítására, hogy náluk a módszertan „ellenőrzés alatt” áll (44). A történeti adatok összeállításának és felhasználásának módjára (azaz az adatok történeti adatokhoz számításának és azok közül való kizárásának kritériumaira, valamint egy adott kísérlet elfogadhatósági kritériumaira) vonatkozó további ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (47).

A kísérleti protokoll bármely módosítását meg kell vizsgálni abból a szempontból, hogy összhangban van-e a laboratórium meglévő történeti kontrolladatbázisaival. Jelentősebb következetlenségek fennállása esetén új történeti kontrolladatbázist kell létrehozni.

A negatív kontrollokra vonatkozó adatok az egy tenyészetből vagy párhuzamos tenyészetek összességéből származó, kromoszóma-rendellenességekkel rendelkező sejtek előfordulását mutatják, ahogyan az a 21. pontban szerepel. A párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben a laboratórium negatív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisa szerinti eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük (44) (47). Amennyiben a párhuzamos negatív kontrollokra vonatkozó adatok a 95 %-os ellenőrzési határértéken kívül esnek, akkor számíthatók be a kontrollok történeti eloszlásába, amennyiben ezek az adatok nem szélsőségesen kiugró értékek, továbbá bizonyíték van arra, hogy a vizsgálati rendszer „ellenőrzés alatt áll” (lásd a 37. pontot), valamint arra, hogy nem áll fenn szakmai vagy emberi mulasztás.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények ismertetése

Az egy vagy több szerkezeti kromoszóma-rendellenességgel rendelkező sejtek százalékos arányát értékelni kell. Az altípusonként (törések, kicserélődések) besorolt, kromatid és kromoszóma típusú rendellenességeket külön-külön kell felsorolni, megadva a számukat és a gyakoriságukat a kísérleti és a kontrolltenyészetek esetében. A gapeket külön-külön kell feljegyezni és jelenteni, de azokat nem kell beleszámolni a rendellenességek összgyakoriságba. A poliploidia és/vagy az endoreduplikált sejtek százalékos arányát észlelés esetén a jelentésbe kell foglalni.

A citotoxicitás egyidejű mérését a rendellenességek megállapítására irányuló fő kísérlet(ek)ben minden kezelt, negatív és pozitív kontrolltenyészet esetében fel kell jegyezni.

Az egyes tenyészetekhez tartozó adatokat meg kell adni. Ezenkívül minden adatot táblázat formájában kell összefoglalni.

Elfogadhatósági kritériumok

Egy-egy vizsgálat elfogadása az alábbi kritériumokon alapul:

— A párhuzamos negatív kontroll a 39. pont szerint belefoglalható a laboratórium negatív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisába.

▼M7

— A párhuzamos pozitív kontrolloknak (lásd a 26. pontot) a pozitív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisban generált válaszokkal összeegyeztethető válaszokat, valamint a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva statisztikailag szignifikáns növekedést kell előidézniük.

— Az oldószeres kontrollban teljesülniük kell a sejtproliferáció kritériumainak (17. és 18. pont).

— Mindhárom kísérleti körülmény vizsgálatára sor került, kivéve, ha az egyik pozitív eredményeket hozott (lásd a 28. pontot).

— Megfelelő számú sejt és koncentráció elemezhető (31. és 21. pont).

— A legmagasabb koncentráció kiválasztására vonatkozó kritériumok összhangban vannak a 22., 23. és 24. pontban ismertetett legmagasabb koncentrációkkal.

Az eredmények értékelése és értelmezése

Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha a vizsgált kísérleti körülmények bármelyikében (lásd a 28. pontot):

a) legalább az egyik vizsgálati koncentráció statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,

b) a megfelelő trendpróbával történő értékelés arra utal, hogy a növekedés a dózissal összefügg,

c) az eredmények bármelyike a történeti negatív kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértékeken; lásd a 39. pontot) kívül esik.

Mindezen kritériumok teljesülése esetén úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag ebben a vizsgálati rendszerben kromoszóma-rendellenességeket képes előidézni a tenyésztett emlőssejtekben. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (49) (50) (51).

Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha valamennyi vizsgált kísérleti körülmény mellett (lásd a 28. pontot):

a) a vizsgálati koncentrációk egyike sem mutat statisztikailag szignifikáns növekedést a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,

b) a megfelelő trendpróbával végzett értékelés nem mutat koncentrációval összefüggő növekedést,

c) valamennyi eredmény a történeti negatív kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértékeken; lásd a 39. pontot) belül van.

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag ebben a vizsgálati rendszerben nem képes kromoszóma-rendellenességeket előidézni a tenyésztett emlőssejtekben.

Az egyértelműen pozitív vagy negatív válasz igazolása nem követelmény.

Amennyiben a reakció nem egyértelműen negatív és nem is egyértelműen pozitív, ahogyan az a fentiekben szerepel, illetve egy adott eredmény biológiai relevanciája megállapításának segítése érdekében az adatokat szakértői véleménnyel és/vagy további vizsgálatokkal kell értékelni. Hasznos lehet további sejtek értékelése (adott esetben) vagy – megismételt kísérlet lehetőleg módosított kísérleti körülmények (például a koncentrációk távolsága, más (S9-es koncentráció vagy S9 eredetű) metabolikus aktiválási feltételek) melletti – elvégzése.

Ritka esetekben, még további vizsgálatok után is, az adatkészlet eleve kizárja a pozitív vagy negatív eredményekre vonatkozó következtetést, és ezért az lesz a következtetés, hogy a vizsgálati vegyi anyagra adott reakció kétértelmű.

▼M7

A poliploid sejtek számának növekedése azt jelezheti, hogy a vizsgálati vegyi anyag potenciálisan gátolhatja a mitotikus folyamatokat és számszerű kromoszóma-rendellenességet idézhet elő (52). Az endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejtek számának növekedése azt jelezheti, hogy a vizsgálati vegyi anyag potenciálisan gátolhatja a sejtciklus végbemenetelét (53) (54) (lásd a 2. pontot). Ezért a poliploid sejtek és az endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejtek előfordulását külön-külön kell feljegyezni.

Vizsgálati jegyzőkönyv

A Vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

— eredet, tételszám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;

— adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tenyészközegben, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-név, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonossága stb.

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai jellemzik.

Oldószer:

— az oldószer kiválasztásának indoklása;

— az oldószernek a végleges tenyészközegen belüli aránya szintén feltüntetendő.

Sejtek:

— a sejtek típusa és eredete;

— a felhasznált sejttípus kariotípus jellemzői és alkalmassága;

— sejtvonalak esetében a mikoplazma hiánya;

— sejtvonalak esetében a sejtciklus hosszúságára, a megkettőződési időre vagy a proliferációs indexre vonatkozó információk;

— a vérdonorok ivara, életkora, valamint a donorra, a teljes vérre vagy az elkülönített limfocitákra, a használt mitogénre vonatkozó bármely releváns információ;

— sejtvonalak esetében a passzálások száma, ha rendelkezésre áll;

— sejtvonalak esetében a sejttenyészetek fenntartásának módszerei;

— sejtvonalak esetében a modális kromoszómaszám.

▼**M7**

Vizsgálati körülmények:

— a metafázis-blokkoló vegyi anyag megnevezése, koncentrációja és a sejtek expozíciójának időtartama;

— a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja a tenyészközegen belüli végleges koncentrációjaként kifejezve (például μg, mg/a tenyészközeg mL-e vagy mM-ja);

— a koncentrációk kiválasztásának és a tenyészetek számának indoklása, beleértve például a citotoxicitási adatokat és az oldhatóságra vonatkozó korlátokat;

— a közeg összetétele, CO_2-koncentráció, amennyiben alkalmazandó, nedvességtartalom;

— a tenyészközeghez adott oldószer és vizsgálati vegyi anyag koncentrációja (és/vagy térfogata);

— inkubációs hőmérséklet;

— inkubációs idő;

— a kezelés időtartama;

— a kezelés utáni begyűjtés időpontja;

— adott esetben a sejtszám a leoltáskor;

— a metabolikus aktivációs rendszer típusa és összetétele (az S9 eredete, az S9 keverék elkészítési módszerei, az S9 keverék és az S9 koncentrációja vagy térfogata a végleges tenyészközegben, az S9 minőségellenőrzése);

— pozitív és negatív kontrollként szolgáló vegyi anyagok, végleges koncentráció az egyes kezelési körülmények esetén;

— az alkalmazott tárgylemez-preparálási módszer és festési technika;

— a vizsgálatok elfogadhatósági kritériumai;

— a rendellenességek értékelésének kritériumai;

— az elemzett metafázisok száma;

— a citotoxicitás mérésére alkalmazott módszerek;

— a citotoxicitás és az alkalmazott módszer szempontjából lényeges kiegészítő információk;

— azok a kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e;

— a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás meghatározására alkalmazott módszerek.

Eredmények:

— sejtvonalak alkalmazásakor az egyes tenyészetek esetében kezelt sejtek száma és begyűjtött sejtek száma;

— a citotoxicitás mérése, például RPD, RICC, MI, egyéb megfigyelések, ha vannak ilyenek;

— sejtvonalak esetében a sejtciklus hosszúságára, a megkettőződési időre vagy a proliferációs indexre vonatkozó információk;

— a kicsapódás jelei és a meghatározás időpontja;

▼M7

— a rendellenességek, többek között a gapek meghatározása;

— az értékelt sejtek száma, a kromoszóma-rendellenességeket mutató sejtek száma és a kromoszóma-rendellenességek típusa, minden egyes kezelt és kontrolltenyészet esetében külön-külön megadva, a gapek figyelembevételével és figyelmen kívül hagyásával;

— a ploidia változásai (poliploid sejtek és endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejtek, külön-külön megadva), ha láthatóak;

— amennyiben lehetséges, a koncentráció-válasz összefüggés;

— a párhuzamos negatív (oldószeres) és pozitív kontrollokra vonatkozó adatok (koncentrációk és oldószerek);

— történeti negatív (oldószeres) és pozitív kontrollokra vonatkozó adatok, a tartományok, az átlagok, a szórás, valamint az eloszlás esetében a 95 %-os ellenőrzési határértékek megadásával, továbbá az adatok száma;

— statisztikai elemzések, p-értékek, ha vannak.

Az eredmények tárgyalása.

Következtetések.

SZAKIRODALOM

(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) E melléklet B.49., *In vitro* celluláris mikronukleusz-vizsgálat emlősökön című fejezete.

(7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.

(8) Scott, D. *et al.* (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 257/2, pp. 147-204.

(9) Morita, T. *et al.* (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pp. 297-305.

(10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagen*esis, Vol. 8/6, pp. 789-886.

▼M7

(11) Long, L.H. *et al.* (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

(12) Nesslany, F. *et al.* (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pp. 439-452.

(13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191-201.

(14) Kirkland, D. *et al.* (2005), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, pp. 1–256.

(15) Greenwood, S. *et al.* (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pp. 36–44.

(16) Hilliard, C.A. *et al.* (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pp. 316–326.

(17) Hedner K. *et al.* (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, pp. 305-309.

(18) Ramsey M.J. *et al.* (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, pp. 95-106.

(19) Coecke S. *et al.* (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261-287.

(20) Henderson, L. *et al.* (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, pp.163-167.

(21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pp. 347-363.

(22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

(23) Natarajan, A.T. *et al.* (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res*earch, Vol. 37/1, pp. 83-90.

(24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/ Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277-290.

(25) Ong, T.-m. *et al.* (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, pp. 55-65.

(26) Elliot, B.M. *et al.* (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175-177.

▼**M7**

(27) Matsushima, T. *et al.* (1976), „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(28) Galloway, S.M. *et al.* (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 241-261.

(29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28/1, pp. 51-59.

(30) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Elérhető a következő internetcímen: 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. Kérésre beszerezhető.

(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. Elérhető a következő internetcímen: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

(44) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS)", Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

(45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

(46) Scott, D. *et al.* (1990), „Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*", in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.

(47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.

(49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

(50) Galloway, S.M. *et al.* (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

(51) Richardson, C. *et al.* (1989), „Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays", in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 29-46.

(53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pp. 403-413.

(54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pp. 1362-1364.

(55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Res*earch, Vol. 312, pp. 139-149.

▼M7

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Aneuploidia: a normális diploid (vagy haploid) kromoszómaszámtól egyetlen kromoszómával vagy egynél több, szám feletti kromoszómával, de nem teljes kromoszómakészlettel (kromoszómakészletekkel) (poliploidia) való bármely eltérés.

Apoptózis: programozott sejthalál olyan lépések során keresztül, amelyek a sejt membránhoz kötött részecskékre történő szétesését eredményezik; a részecskék ezután fagocitózissal vagy sejtfelszínről történő leválással kerülnek eltávolításra.

Sejtproliferáció: a sejtek számának növekedése mitotikus sejtosztódással.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Kromatidtörés: egyetlen kromatid megszakadása, amit az egyik kromatid egyértelmű átrendeződése jelez.

Kromatid gap: egyetlen kromatid meg nem festődő régiója (akromatikus sérülése), ahol minimális a kromatid átrendeződése.

Kromatid típusú rendellenesség: olyan szerkezeti kromoszómakárosodás, amely a különálló kromatidok törésében vagy a kromatidok közötti törésben és újraegyesülésben nyilvánul meg.

Kromoszóma típusú rendellenesség: olyan szerkezeti kromoszómakárosodás, amely a két kromatid azonos helyén történt törésében, vagy törésében és újraegyesülésében nyilvánul meg.

Klasztogén: bármely olyan vegyi anyag, amely sejtek vagy eukarióta szervezetek populációjában szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket okoz.

Koncentrációk: a vizsgálati vegyi anyagnak a tenyészközegen belüli végleges koncentrációira utalnak.

Citotoxicitás: az e vizsgálati módszerbe tartozó, sejtvonalak segítségével végzett vizsgálatok esetében a citotoxicitás a kezelt sejtek relatív populációduplázódásában (RPD) vagy a számuk relatív növekedésében (RICC) bekövetkezett csökkenés a negatív kontrollhoz viszonyítva (lásd a 17. pontot és a 2. függeléket). Az e vizsgálati módszerbe tartozó, primer limfocita-tenyészetek segítségével végzett vizsgálatok esetében a citotoxicitás a kezelt sejtek mitotikus indexének (MI) csökkenése a negatív kontrollhoz viszonyítva (lásd a 18. pontot és a 2. függeléket).

Endoreduplikáció: az a folyamat, amely során valamely DNS-replikáció S fázisát követően a sejtmag nem lép be a mitózis fázisába, hanem egy másik S fázist indít. Az eredmény 4, 8, 16, … kromatiddal rendelkező kromoszómák létrejötte.

Genotoxikus: olyan általános kifejezés, amely magában foglalja a DNS- vagy kromoszómakárosodás valamennyi típusát, köztük a töréseket, a deléciókat, az adduktok képződését, a nukleotidok módosulását és kapcsolódását, az átrendeződéseket, a génmutációkat, a kromoszóma-rendellenességeket és az aneuploidiát. A genotoxikus hatás nem minden típusa eredményez mutációkat vagy stabil kromoszómakárosodást.

Mitotikus index (MI): a metafázisban lévő sejtek és a sejtpopuláció összes sejtjének aránya; e populáció proliferációja mértékének jelzése.

Mitózis: a sejtmag osztódása, amely általában profázisra, prometafázisra, metafázisra, anafázisra és telofázisra osztható fel.

Mutagén: örökletes elváltozást idéz elő a génekben lévő DNS-bázispár szekvenciában/szekvenciákban vagy a kromoszómák szerkezetében (kromoszóma-rendellenességek).

▼M7

Számszerű rendellenesség: a kromoszómák számának eltérése a felhasznált sejtekre jellemző normál számértéktől.

Poliploidia: ellentétben a csak egyetlen kromoszómát vagy bizonyos kromoszómákat érintő számszerű rendellenességekkel (aneuploidia), teljes kromoszómakészlet(ek) sejtekben és organizmusokban jelentkező számszerű rendellenessége.

p53 státusz: A p53 fehérje vesz részt a sejtciklus-szabályozásban, az apoptózisban és a DNS-reparációban. Azoknak a sejteknek, amelyeknél hiányzik funkcionális p53 fehérje, nem képesek apoptózis útján vagy a DNS-károsodásra reagáló p53 funkciókkal összefüggő egyéb mechanizmusok útján (például DNS-reparáció kiváltásával) leállítani a sejtciklust vagy eltávolítani a károsodott sejteket, elméletileg hajlamosabbnak kell lenniük génmutációkra vagy kromoszóma-rendellenességekre.

A sejtszám relatív növekedése (RICC): a kémiai expozíciónak kitett tenyészetekben tapasztalható sejtszámnövekedés a nem kezelt tenyészetekben tapasztalható növekedéshez viszonyítva; százalékos arányként kifejezett viszonyszám.

Relatív populációduplázódás (RPD): a populációduplázódások számának növekedése a kémiai expozíciónak kitett tenyészetekben, a nem kezelt tenyészetekben tapasztalható növekedéshez viszonyítva; százalékos arányként kifejezett viszonyszám.

S9 májfrakció: 9 000 g centrifugálás utáni májhomogenátum felülúszója, azaz a nyers májextraktum.

S9 keverék: az S9 májfrakció és a metabolikus enzimaktivitáshoz szükséges kofaktorok keveréke.

Oldószeres kontroll: a csak a vizsgálati vegyi anyag feloldására használatos oldószert befogadó kontrolltenyészetek meghatározására szolgáló általános kifejezés.

Szerkezeti rendellenesség: a sejtosztódás metafázisának mikroszkopikus vizsgálata során – deléciókként és fragmensekként, kromoszómán belüli vagy a kromoszómák közötti átrendeződésként – észlelhető változás a kromoszóma szerkezetében.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Nem kezelt kontrollok: nem kezelt (azaz sem a vizsgálati vegyi anyaggal, sem oldószerrel nem kezelt), de a vizsgálati vegyi anyagot befogadó tenyészetekkel párhuzamosan, azonos módon feldolgozott tenyészetek.

▼M7

2. függelék

A CITOTOXICITÁS ÉRTÉKELÉSÉRE SZOLGÁLÓ KÉPLETEK

Mitotikus index (MI):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{mitotikus sejtek száma}}{\text{a pontozott sejtek száma}} \times 100$$

A **sejtszám relatív növekedése (RICC)** vagy a **relatív populációduplázódás (RPD)** ajánlott, mivel mindkét módszer figyelembe veszi az osztódott sejtpopuláció arányát.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{a kezelt tenyészeteken belüli setjszám növekedése}(\text{final} - \text{starting}))}{(\text{a kontrolltenyészetek sejtszámának növekedése}(\text{final} - \text{starting}))} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{a populációduplázódások száma a kezelt tenyészetekben})}{(\text{a populációduplázódások száma a kontrolltenyészetekben})} \times 100$$

ahol:

Populációduplázódás = [log (kezelés utáni sejtszám ÷ kiindulási sejtszám)] ÷ log 2

Például 53 %-os RICC vagy RPD 47 %-os citotoxicitást/citosztázist jelez, az MI segítségével mért 55 %-os citotoxicitás/citosztázis pedig azt jelenti, hogy a tényleges MI a kontroll 45 %-a.

A kezelés előtti sejtszámot minden esetben meg kell mérni, és annak meg kell egyeznie a kezelt és a negatív kontrolltenyészetek esetében.

Míg az RCC (azaz a kezelt tenyészeteken belüli sejtszám és a kontrolltenyészeteken belüli sejtszám hányadosa) a múltban citotoxicitási paraméterként volt használatos, a továbbiakban már nem javasolt, mivel alulbecsülheti a citotoxicitást.

A negatív kontrolltenyészetekben a populációduplázódásnak összeegyeztethetőnek kell lennie azzal a követelménnyel, hogy a sejtekből a kezelés után körülbelül 1,5 normál sejtciklusidőnek megfelelő időpontban kell mintát venni, valamint a mitotikus indexnek kellően magasnak kell lennie ahhoz, hogy elegendő számú, mitózisban lévő sejtet lehessen kapni és megbízhatóan ki lehessen számítani egy 50 %-os csökkenést.

▼M7

B.11. KROMOSZÓMA-RENDELLENESSÉGEK VIZSGÁLATA EMLŐSÖK CSONTVELŐJÉBEN

BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 475. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. E vizsgálati módszer a genetikai toxikológiai vizsgálati módszerek sorozatának részét képezi. Kidolgozásra került egy, a genetikai toxikológiai vizsgálatokról tömör tájékoztatást nyújtó, a vizsgálati iránymutatások közelmúltbeli változásait áttekintő OECD-dokumentum (1).

A kromoszóma-rendellenességeknek az emlősök csontvelőjében végzett *in vivo* vizsgálata azért különösen releváns a genotoxicitás értékelése szempontjából, mert az *in vivo* metabolizmus tényezői, a farmakokinetikai és a DNS-reparációs folyamatok – bár fajonként változhatnak – aktívak és hozzájárulnak a reakciókhoz. Az *in vivo* vizsgálat valamely *in vitro* rendszer által kimutatott genotoxicitás további vizsgálatához is hasznos.

A kromoszóma-rendellenességek emlősökön végzett *in vivo* vizsgálata a vizsgálati vegyi anyag által az állatok – rendszerint rágcsálók – csontvelősejtjeiben előidézett szerkezeti kromoszóma-rendellenességek kimutatására használatos (2), (3), (4), (5). A szerkezeti kromoszóma-rendellenességek kétféle típusúak lehetnek: kromoszóma vagy kromatid típusú rendellenességek. Bár a genotoxikus vegyi anyagok többsége által előidézett rendellenességek többsége kromatid típusú, kromoszóma típusú rendellenességek is előfordulnak. A kromoszómakárosodás és az ehhez kapcsolódó események számos emberi genetikai betegséget okoznak, és érdemi bizonyíték van arra, hogy amikor ezek a léziók és a kapcsolódó események az onkogénekben és a tumorszuppresszor génekben okoznak elváltozásokat, szerepet játszanak az emberekben és a kísérleti rendszerekben kialakuló rákban. Poliploidia (többek között endoreduplikáció) felléphet a kromoszóma-rendellenességek *in vivo* vizsgálata során. A poliploidia fokozódása azonban önmagában nem jelez aneugén potenciált, egyszerűen sejtcikluszavarra vagy citotoxicitásra utalhat. E vizsgálatnak nem az aneuploidia mérése a célja. Az *in vivo* emlős eritrocita mikronukleusz-vizsgálat (e melléklet B.12. fejezete) vagy az emlősökön végzett *in vitro* celluláris mikronukleusz-vizsgálat (e melléklet B.49. fejezete) lenne az aneuploidia kimutatására ajánlott *in vivo*, illetve *in vitro* vizsgálat.

A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

E vizsgálatban rendszerint rágcsálók használatosak, de egyes esetekben – amennyiben tudományosan indokolt – más fajok is megfelelőek lehetnek. E vizsgálatban a csontvelő a célszövet, mivel egy gazdagon vaszkularizált szövet, és olyan gyorsan szaporodó sejtek populációját tartalmazza, amelyek könnyen izolálhatók és preparálhatók. Patkányoktól és egerektől eltérő fajok használatának tudományos indokolását közölni kell a jelentésben. Rágcsálóktól eltérő fajok használata esetén a csontvelő kromoszóma-rendellenességének mérését ajánlatos integrálni egy másik megfelelő toxicitásvizsgálatba.

Ha létezik arra vonatkozó bizonyíték, hogy a vizsgálati vegyi anyag(ok), vagy annak (azoknak) a metabolitja(i) nem éri(k) el a célszövetet, e vizsgálat alkalmazása nem feltétlenül megfelelő.

A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

▼M7

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az állatokat a megfelelő expozíciós úton kell kitenni a vizsgálati vegyi anyagnak, majd a kezelés után megfelelő időpontban humánus módon eutanáziát kell azokon végrehajtani. Az eutanázia előtt az állatokat metafázis-blokkoló szerrel (például kolchicinnel vagy kolcemiddel) kell kezelni. Ezután kromoszóma-preparálást kell végezni a csontvelősejtekből és azokat meg kell festeni, majd elemezni kell a metafázisban lévő sejteket kromoszóma-rendellenességek megállapítása céljából.

A LABORATÓRIUM JÁRTASSÁGÁNAK IGAZOLÁSA

A jártasság vizsgálata

A laboratóriumoknak a vizsgálat rutinszerű alkalmazása előtti, a vizsgálat lefolytatásával kapcsolatos elegendő tapasztalat igazolása érdekében bizonyítottan képesnek kell lenniük a közzétett (például (6) irodalom), a kromoszóma-rendellenességek gyakoriságára vonatkozó adatok alapján várható eredmények reprodukálására legalább két, pozitív kontrollként szolgáló – például az 1. táblázatban felsorolt – vegyi anyaggal (ideértve az alacsony dózisban adagolt pozitív kontrollok által kiváltott gyenge reakciókat is) és kompatibilis vivőanyagos/oldószeres kontrollokkal (lásd a 22. pontot). E kísérletek során olyan dózisokat kell alkalmazni, amelyek reprodukálható és dózissal összefüggő növekedést biztosítanak, továbbá bizonyítják a vizsgálati rendszer érzékenységét és dinamikus tartományát az érintett szövetben (a csontvelőben), a laboratóriumon belül alkalmazandó értékelési módszer használatával. Ez a követelmény nem vonatkozik azokra a laboratóriumokra, amelyek tapasztalattal rendelkeznek, azaz amelyeknek a rendelkezésére áll 10–14. pontban meghatározott történeti adatbázis.

Történeti kontrolladatok

A jártassági vizsgálatok során a laboratóriumnak meg kell állapítania a következőket:

— a pozitív kontrollok történeti tartománya és eloszlása, valamint

— a negatív kontrollok történeti tartománya és eloszlása.

A negatív kontrollok történeti eloszlásához kapcsolódó első adatgyűjtés során a párhuzamos negatív kontrolloknak összhangban kell lenniük a kontrollokra vonatkozóan közzétett adatokkal, amennyiben léteznek. Amint több kísérleti adat adódik a kontrollok történeti eloszlásához, a párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben az eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük. A laboratórium negatív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisának statisztikailag megbízhatónak kell lennie annak garantálása érdekében, hogy a laboratórium képes legyen ellenőrizni a negatív kontrollra vonatkozó adatok eloszlását. A szakirodalom szerint legalább 10 kísérletre lehet szükség, de az adatbázisnak lehetőség szerint legalább 20, összehasonlítható kísérleti körülmények között végzett kísérletet kell tartalmaznia. A laboratóriumoknak minőségellenőrzési módszereket, például ellenőrzési diagramokat (C-diagramokat vagy X-bar diagramokat (7)) kell alkalmazniuk annak meghatározására, hogy a pozitív és a negatív kontrollokra vonatkozó adataik mennyire változóak, valamint annak bizonyítására, hogy náluk a módszertan „ellenőrzés alatt” áll. A történeti adatok összeállításának és felhasználásának módjára (azaz az adatok történeti adatokhoz számításának és azok közül való kizárásának kritériumaira, valamint egy adott kísérlet elfogadhatósági kritériumaira) vonatkozó további ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (8).

Amennyiben a laboratórium nem végez elegendő számú kísérletet a negatív kontrollok statisztikailag megbízható eloszlásának megállapítására (lásd a 11. pontot) a (9. pontban ismertetett) jártassági vizsgálatok során, elfogadható, hogy az eloszlást az első rutinszerű vizsgálatok során határozzák meg. Ennek a megközelítésnek a (8) hivatkozásban foglalt ajánlásokat kell követnie, és az e kísérletek során kapott negatív kontrolleredményeknek továbbra is összhangban kell lenniük a negatív kontrollokra vonatkozóan közzétett adatokkal.

▼M7

A kísérleti protokoll bármely módosítását meg kell vizsgálni abból a szempontból, hogy milyen hatást gyakorol a létrejött adatoknak a laboratórium meglévő történeti kontrolladatbázisával való összhangjára. Csak jelentősebb következetlenségek fennállása esetén kell új történeti kontrolladatbázist létrehozni, amennyiben szakértői vélemény megállapítja az adatok korábbi eloszlástól való eltérését (lásd a 11. pontot). Az újbóli létrehozás során nem feltétlenül van szükség negatív kontrollokat tartalmazó teljes adatbázisra egy tényleges vizsgálat lebonyolításához, amennyiben a laboratórium bizonyítani tudja, hogy a párhuzamos negatív kontrolljainak értékei továbbra is összhangban lesznek a korábbi adatbázisával vagy a kapcsolódó, közzétett adatokkal.

A negatív kontrollokra vonatkozó adatok a (gapeken kívüli) szerkezeti kromoszóma-rendellenességek egyes állatokban történő előfordulását mutatják. A párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben a laboratórium negatív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisa szerinti eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük. Amennyiben a párhuzamos negatív kontrollokra vonatkozó adatok a 95 %-os ellenőrzési határértéken kívül esnek, akkor számíthatók be a kontrollok történeti eloszlásába, amennyiben ezek az adatok nem szélsőségesen kiugró értékek, továbbá bizonyíték van arra, hogy a vizsgálati rendszer „ellenőrzés alatt áll” (lásd a 11. pontot), valamint arra, hogy nem áll fenn szakmai vagy emberi mulasztás.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Az állatfaj kiválasztása

Egészséges, fiatal, ivarérett, általánosan használt laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni. A patkányok általánosan használtak, bár az egerek is megfelelőek lehetnek. Bármely egyéb megfelelő emlősfaj használható, ha a jelentésben szerepel tudományos indokolás.

Az állatok tartásának és etetésének körülményei

Rágcsálók esetében a kísérleti helyiség hőmérsékletének 22 °C (±3 °C)-nak kell lennie. Bár ideális esetben a helyiség relatív páratartalmának 50–60 %-nak kell lennie, legyen legalább 40 %, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgálati vegyi anyaggal való megfelelő keveredés szükségessége is befolyásolhatja, ha a vizsgálati vegyi anyag beadása ilyen módon történik. Ha agresszív viselkedés nem várható, a rágcsálókat azonos ivarú és azonos kezelt csoporthoz tartozó kis csoportokban, lehetőleg szilárd aljú, megfelelő környezetgazdagítással ellátott ketrecekben kell tartani (ketrecenként legfeljebb öt egyed tartható). Az állatok kizárólag tudományosan indokolt esetben tarthatók egyenként.

Az állatok előkészítése

Szokásosan egészséges, fiatal, ivarérett állatokat kell alkalmazni (rágcsálók esetén ideális esetben a kezelés kezdetén 6–10 hetes állatokat, bár valamivel idősebb állatok is elfogadhatóak), és azokat véletlenszerűen kontroll- és kezelt csoportokba kell osztani. Az egyes állatokat humánus, minimálisan invazív módszerrel (például gyűrűzéssel, címkézéssel, mikrocsip beültetésével vagy biometrikus azonosítással, de a fül vagy a lábujj kilyukasztása nélkül) egyedi azonosítóval kell ellátni, és legalább öt napig szoktatni kell a laboratóriumi körülményekhez. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek a ketrec elhelyezéséből adódó esetleges hatások. A pozitív kontrollal és a vizsgálati vegyi anyaggal való keresztszennyeződés kerülendő. A vizsgálat kezdetén az állatok tömege közötti eltérésnek minimálisnak kell lennie és nem haladhatja meg az ivaronkénti átlag ± 20 %-át.

A dózisok előkészítése

Az állatoknak történő adagolás előtt a szilárd halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni kell megfelelő oldószerekben vagy vivőanyagokban, vagy bele kell keverni a takarmányba vagy az ivóvízbe. A folyékony vizsgálati vegyi anyagok közvetlenül adagolhatók vagy az adagolás

▼M7

előtt hígíthatók. Belélegzéses expozíció esetén a vizsgálati vegyi anyagok fizikai-kémiai tulajdonságaiktól függően gáz, gőz vagy szilárd/folyadék aeroszol formában adagolhatók. A vizsgálati vegyi anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve akkor, ha a stabilitási adatok bizonyítják a tárolás elfogadhatóságát és meghatározzák a megfelelő tárolási feltételeket.

Oldószer/Vivőanyag

Az oldószer/vivőanyag nem okozhat toxikus hatásokat az alkalmazott dózisok mellett, és nem alkalmazható olyan oldószer/vivőanyag, amelyről feltehető, hogy kémiai reakcióba fog lépni a vizsgálati vegyi anyagokkal. Jól ismert oldószerektől eltérő oldószerek/vivőanyagok alkalmazása esetén azok használatát alá kell támasztani a kompatibilitásukat jelző referenciaadatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát ajánlatos megfontolni. Általánosan használt, kompatibilis oldószer/vivőanyag például többek között a víz, a fiziológiás sóoldat, a metilcellulóz oldat, a karboximetil-cellulóz-nátriumsó oldat, az olívaolaj és a kukoricaolaj. Azt igazoló történeti vagy közzétett adatok hiányában, hogy a választott atipikus oldószer/vivőanyag nem idéz elő szerkezeti rendellenességet vagy más ártalmas hatást, kiindulási vizsgálatot kell lebonyolítani az oldószeres/vivőanyagos kontroll elfogadhatóságának megállapítása érdekében.

Kontrollok

Pozitív kontrollok

Általában minden vizsgálat során alkalmazni kell olyan állatcsoportot, amelyet pozitív kontrollként szolgáló vegyi anyaggal kezeltek. Ettől el lehet tekinteni, ha a vizsgálólaboratórium bizonyítja a vizsgálat lebonyolításában való jártasságát és megállapítja a pozitív kontrollok történeti tartományát. Párhuzamos pozitív kontrollcsoport hiányában minden egyes kísérletben értékelési kontrollokat (fixált és megfestetlen tárgylemezeket) kell alkalmazni. Ezek oly módon kaphatók meg, hogy a vizsgálat értékelésébe beszámítanak a vizsgálat lebonyolítása szerinti laboratóriumban rendszeres időközönként (például 6–18 hónaponként) – például a jártasság vizsgálata során, vagy szükség esetén azt követően rendszeresen – pozitív kontrollokkal végzett különálló kísérlettel létrejött és tárolt megfelelő referenciamintákat.

A pozitív kontrollként szolgáló vegyi anyagoknak megbízható módon ki kell váltaniuk a szerkezeti kromoszóma-rendellenességekkel rendelkező sejtek spontán szinthez képest kimutathatóan gyakoribbá válását. A pozitív kontrollok dózisát úgy kell megválasztani, hogy a hatások egyértelműek legyenek, de az értékelő ne tudja beazonosítani azonnal a kódolt mintákat. Elfogadható, hogy a pozitív kontroll beadása a vizsgálati vegyi anyagétól eltérő módon, más kezelési ütemtervvel történjen, és hogy mintavételre csak egyetlen időpontban kerüljön sor. Ezen túlmenően, adott esetben megfontolható a vegyi anyagokkal azonos kémiai osztályba tartozó pozitív kontrollok használata. A pozitív kontrollként szolgáló vegyi anyagokra az 1. táblázat tartalmaz példákat.

1. táblázat

Példák pozitív kontrollként szolgáló vegyi anyagokra

Vegyi anyag	CASRN
Etil-metánszulfonát	62-50-0
Metil-metánszulfonát	66-27-3
N-etil-N-nitrozo-karbamid	759-73-9
Mitomicin-C	50-07-7
Ciklofoszfamid monohidrát	50-18-0 (6055-19-2)
Trietilén-melamin	51-18-3

▼M7

Negatív kontrollok

A negatív kontrollcsoport állatait minden mintavételi időpontban figyelembe kell venni, és azokat egyébként a kezelt csoportokkal azonos bánásmódban kell részesíteni, kivéve, hogy nem kapnak kezelést a vizsgálati vegyi anyaggal. Ha a vizsgálati vegyi anyag beadása során oldószert/vivőanyagot alkalmaznak, a kontrollcsoportnak meg kell kapnia ezt az oldószert/vivőanyagot. Ha azonban a vizsgálólaboratórium történeti adatai azt igazolják, hogy a negatív kontrollból származó, kromoszóma-rendellenességeket mutató sejtek állatok közötti sokfélesége és gyakorisága állandó minden mintavételi időpontban, a negatív kontrollokból elegendő lehet csak egyetlen mintavétel is. Amennyiben a negatív kontrollokhoz egyetlen mintavételt alkalmaznak, azt a vizsgálat során alkalmazott első mintavételi időpontban kell elvégezni.

ELJÁRÁS

Az állatok száma és ivara

A mikronukleusz-válasz általában hasonló a hím- és a nőivarú állatok körében (9), és ez várhatóan érvényes lesz a szerkezeti kromoszóma-rendellenességekre is; ezért a vizsgálatok többségét bármelyik ivarnál el lehet végezni. A hímek és a nőstények közötti lényeges eltéréseket (például a szisztémás toxicitás, a metabolizmus, a biológiai hasznosíthatóság, a csontvelő-toxicitás stb. többek között dózisbehatároló vizsgálattal megállapított eltéréseit) bizonyító adatok mindkét ivar használatát ösztönöznék. Ebben az esetben helyénvaló lehet mindkét ivarnál vizsgálatot végezni, például ismételt dózisú toxicitási vizsgálat keretében. Mindkét ivar használata esetén helyénvaló lehet a faktoriális kísérlettervezés alkalmazása. Az e kísérlettervezés segítségével végzendő adatelemzés részletei a 2. függelékben találhatók.

A vizsgálat megkezdésekor a csoportok méretét úgy kell megállapítani, hogy csoportonként legalább öt azonos ivarú – illetve mindkét ivar használata esetén mindkét ivarból öt – elemezhető állat legyen. Amennyiben a vegyi anyagoknak való emberi expozíció szexspecifikus lehet, mint például egyes gyógyszerek esetében, a vizsgálatot a megfelelő ivarú állatokkal kell elvégezni. Útmutatás az állatok maximális számára vonatkozó tipikus követelményhez: a három dózis-csoporttal és egy párhuzamos negatív kontrollcsoporttal, továbbá egy pozitív kontrollcsoporttal (melyek mindegyike öt, egy ivarhoz tartozó állatból áll) két mintavételi időpontban végzett csontvelővizsgálathoz 45 állatra lenne szükség.

Dózisszintek

Ha előzetes dózisbehatároló vizsgálatra kerül sor amiatt, hogy már nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok a dózisok kiválasztásának segítéséhez, azt ugyanazon laboratóriumban, ugyanazon fajok, törzsek, ivarok és kezelési eljárások alkalmazásával kell végrehajtani, mint amelyek a fő vizsgálatban alkalmazandóak (10). A vizsgálatnak a maximális tolerálható dózis (MTD) meghatározására kell irányulnia, amely anélkül, hogy vizsgálatkorlátozó toxicitást mutatna, a legmagasabb tolerált dózis a vizsgálati időszak tartamához viszonyítva (például testtömegcsökkenést vagy vérképző rendszeri citotoxicitást vált ki), de elhullást, illetve humánus eutanáziát igénylő, bizonyított fájdalmat, szenvedést vagy szorongást nem idéz elő (11).

A legmagasabb dózis a csontvelőben toxicitásra utaló jeleket kiváltó dózisként is meghatározható.

Azok a vegyi anyagok, amelyek a toxikokinetikai tulajdonságok telítődését mutatják, vagy olyan detoxifikációs folyamatokat idéznek elő, amelyek hosszú távú kezelés után az expozíció csökkenéséhez vezethetnek, kivételek lehetnek a dózisbeállítási kritériumok alól, és azokat eseti alapon kell értékelni.

Annak érdekében, hogy dózis-válasz adatokat lehessen szerezni, a teljes vizsgálatnak egy negatív kontrollcsoportot, valamint legalább három dózisszintet kell tartalmaznia, ahol a dózisszintek közötti szorzótényező általában 2, de legfeljebb 4. Ha a vizsgálati vegyi anyag nem okoz toxicitást a dózisbehatároló vizsgálatban vagy meglévő adatok alapján, egyetlen beadás esetén a legmagasabb

▼M7

dózisnak 2 000 mg/testtömegkilogrammnak kell lennie. Ha azonban a vizsgálati vegyi anyag toxicitást okoz, az MTD-nek a beadott legmagasabb dózisnak kell lennie, és a használt dózisszintek lehetőleg fedjék le a maximálistól az alacsony mértékű toxicitást okozó vagy toxicitást egyáltalán nem okozó dózisig terjedő tartományt. Ha a célszövet (csontvelő) toxicitása valamennyi vizsgált dózisszintnél megfigyelhető, érdemes nem toxikus dózisoknál további vizsgálatot végezni. A mennyiségi dózis-válasz adatok teljesebb körű jellemzését célzó vizsgálatok további dóziscsoportokat tehetnek szükségessé. Ezek a határértékek a vizsgálati vegyi anyagok bizonyos, külön követelmények hatálya alá tartozó típusai (például a humán gyógyszerek) esetében változóak lehetnek.

Határérték-vizsgálat

Ha a dózisbehatároló kísérletek vagy a rokon állattörzsekből származó meglévő adatok azt jelzik, hogy a legalább a határdózist tartalmazó (az alábbiakban ismertetett) kezelési eljárás semmilyen megfigyelhető toxikus hatást nem vált ki, (többek között nem váltja ki a csontvelősejtek proliferációjának visszaesését vagy a célszövet citotoxicitásának más bizonyítékát), és ha nem várható genotoxicitás az *in vitro* genotoxicitási vizsgálatok alapján vagy a szerkezetileg rokon anyagokra vonatkozó adatok alapján, akkor nem feltétlenül tekintendő szükségesnek három dózis használatával végrehajtott teljes vizsgálat, amennyiben bizonyítást nyert, hogy a vizsgálati vegyi anyag(ok) eléri(k) a célszövetet (a csontvelőt). Ilyen esetekben a határdózisnál alkalmazott egyetlen dózisszint elegendő lehet. 14 napot meghaladó beadási időszak esetén a határdózis 1 000 mg/testtömeg kg/nap. A legfeljebb 14 napig tartó beadási időszak esetén a határdózis 2 000 mg/testtömeg kg/nap.

A dózisok beadása

Az emberi expozíció várható útját figyelembe kell venni a vizsgálat tervezése során. Ezért az egyéb expozíciós utak (például takarmány, ivóvíz, helyi szubkután, intravénás, orális (gyomorszondával), inhalációs, intratracheális vagy implantáció) is kiválaszthatók indokoltként. Az utat mindenesetre úgy kell kiválasztani, hogy biztosítsa a célszövet(ek) megfelelő expozícióját. A hasüregbe adott injekció nem ajánlott, mivel az nem tervezett emberi expozíciós út, és kizárólag tudományos indokolással alkalmazható. Ha a vizsgálati vegyi anyagot a takarmányba vagy ivóvízbe keverik, különösen egyszeri adagolás esetén ügyelni kell arra, hogy a táplálék és a víz fogyasztása és a mintavétel közötti idő elegendő legyen a hatások kimutathatóságához (lásd a 33–34. pontot). A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata rendszerint nem haladhatja meg az 1 ml/100 testtömeggramm mennyiséget, kivéve vizes oldatok esetén, amelyeknél legfeljebb 2 ml/100 testtömeggramm használható. Ennél nagyobb mennyiségek használatát meg kell indokolni. A magasabb koncentrációértékeknél rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy maró vizsgálati vegyi anyagok kivételével, a koncentráció megfelelő beállításával minimálisra kell csökkenteni a vizsgálati vegyi anyag mennyiségének eltéréseit, hogy valamennyi dózisszinten a testtömeghez viszonyítva konstans mennyiséget lehessen beadni a kísérleti állatoknak.

A kezelés ütemterve

A vizsgálati vegyi anyag beadása rendszerint egyszeri dózissal történik, nagy mennyiségű anyag beadásának megkönnyítése érdekében azonban kettéosztott dózissal is beadható (például ugyanazon a napon két vagy több alkalommal, legfeljebb 2–3 órás időközzel). Ilyen körülmények között, vagy amikor a vizsgálati vegyi anyag beadása inhaláció útján történik, a mintavétel időpontját az utolsó dózis beadásának vagy az expozíció végének időpontja alapján kell ütemezni.

Ehhez a vizsgálathoz kevés adat áll rendelkezésre az ismételt dózisú protokoll megfelelőségére vonatkozóan. Olyan körülmények között azonban, amikor érdemes kiegészíteni ezt a vizsgálatot ismételt dózisú toxicitási vizsgálattal, ügyelni kell a károsodott kromoszómájú mikotikus sejtek toxikus dózisoknál

▼M7

esetlegesen előforduló elveszítésének elkerülésére. Ez a kiegészítés elfogadható, amikor a legmagasabb dózis meghaladja a határdózist vagy megegyezik azzal (lásd a 29. pontot), és egy dóziscsoport a kezelési időszak során mindvégig megkapja a határdózist. A mikronukleusz-vizsgálat (a B.12. vizsgálati módszer) a kromoszóma-rendellenességek esetén első választásnak minősülő *in vivo* vizsgálatnak tekintendő, ha más vizsgálatokkal való integráció célszerű.

A csontvelőből két külön időpontban kell mintát venni az egyszeri dózissal végzett kezeléseket követően. Rágcsálók esetében az első mintavételi időköznek 1,5 normál sejtciklusidőhöz szükséges időnek kell lennie (ez utóbbi rendszerint a kezelési időszak utáni 12–18 órát jelenti). Mivel a vizsgálati vegyi anyag(ok) felvételéhez és anyagcseréjéhez szükséges idő, valamint annak a sejtciklus-kinetikára gyakorolt hatása befolyásolhatja a kromoszóma-rendellenesség kimutatásának optimális időpontját, az első mintavételi időpont után 24 órával ajánlott egy későbbi mintavétel. Az első mintavételi időpontban minden dóziscsoportot kezelni kell, és azokból elemzés céljára mintát kell gyűjteni, a későbbi mintavételi időpont(ok)ban azonban csak a legmagasabb dózist kell beadni. Ha tudományos indokolás alapján egy napnál hosszabb adagolási eljárást alkalmaznak, a mintavételt általában az utolsó kezelést követő legfeljebb kb. 1,5 normál sejtciklusidő elteltekor kell elvégezni.

A kezelést követően és a mintavétel előtt az állatokba hasüregbe adva megfelelő dózisú metafázis-blokkoló szert (például kolcemidet vagy kolchicint) kell befecskendezni, és ezt követően megfelelő idő elteltével mintát kell venni. Egerek esetében ez a megfelelő idő körülbelül 3–5 óra, patkányok esetében pedig 2–5 óra. A sejteket ki kell nyerni a csontvelőből, meg kell duzzasztani, fixálni kell és meg kell festeni, majd elemezni kell azokat a kromoszóma-rendellenességek szempontjából (12).

Megfigyelések

A kísérleti állatok esetében általános klinikai megfigyeléseket kell tenni, és a klinikai tüneteket legalább naponta egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban rögzíteni kell, továbbá figyelembe kell venni az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Az adagolási időszakban naponta legalább kétszer meg kell vizsgálni az összes állatot megbetegedés és elhullás szempontjából. Minden állat tömegét le kell mérni a vizsgálat megkezdésekor, az ismételt dózisú vizsgálatok esetén hetente legalább egyszer, valamint az állatok leölésekor. A legalább egy hétig tartó vizsgálatok során a felvett táplálék mennyiségét legalább heti rendszerességgel le kell mérni. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag beadására az ivóvízzel együtt kerül sor, a vízfogyasztást minden vízcsere alkalmával és legalább hetente le kell mérni. A túlzott toxicitás nem halálos jeleit mutató állatokon a vizsgálati időszak befejeződése előtt humánus módon eutanáziát kell végrehajtani (11).

A célszövet expozíciója

Amennyiben indokolt, és amennyiben más expozíciós adatok nem léteznek (lásd a 44. pontot), megfelelő időpont(ok)ban vérmintát kell venni annak érdekében, hogy a vizsgálati vegyi anyagok plazmában lévő szintjét meg lehessen vizsgálni annak bizonyítása céljából, hogy a csontvelő expozíciója megtörtént.

Csontvelő- és kromoszóma-preparátumok

Közvetlenül a humánus módon végrehajtott eutanáziát követően az állatok combcsontjából vagy sípcsontjából csontvelősejteket kell venni, azokat hipotonizálni, majd fixálni kell. A metafázisban lévő sejteket tárgylemezeken szét kell teríteni és bevált módszerek segítségével meg kell festeni (lásd a (3) és a (12) hivatkozást).

▼M7

Elemzés

Az elemzés előtt minden tárgylemezt, a pozitív és negatív kontrollokét is ideértve, önálló kódolással kell ellátni, és azokat véletlenszerűen kell elrendezni, hogy az értékelést végző személy ne ismerje a kezelés körülményeit.

Minden kezelt állat (a pozitív kontrollállatokat is ideértve), továbbá a nem kezelt, vagy a vivőanyaggal/oldószerrel kezelt negatív kontrollba beosztott minden állat esetében állatonként legalább 1 000 sejtben meg kell határozni a mitiotikus indexet a citotoxicitás mérőszámaként.

Minden egyes állat esetében legalább 200 metafázist kell elemezni a szerkezeti kromoszóma-rendellenességek szempontjából, a gapek figyelembevételével és figyelmen kívül hagyásával is (6). Ha azonban a negatív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázis szerint a szerkezeti kromoszóma-rendellenességek gyakoriságának átlagos háttérértéke 1 %-nál kevesebb a vizsgálólaboratóriumban, meg kell fontolni további sejtek értékelését. A kromatid és a kromoszóma típusú rendellenességeket külön-külön kell feljegyezni és altípusonként (törések, kicserélődések) kell besorolni. A laboratóriumban alkalmazott eljárásoknak biztosítaniuk kell, hogy a kromoszóma-rendellenességeket jól képzett értékelők elemezzék, és adott esetben szakértők értékeljék. Elismerve, hogy a tárgylemezek előkészítésére szolgáló eljárások következtében gyakran megszakad a metafázisok bizonyos aránya, ami kromoszómaveszteséggel jár, a kiértékelt sejteknek ezért legalább $2n\pm2$ számú centromérát kell tartalmazniuk, ahol n az adott faj esetében a haploid kromoszómaszám.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények feldolgozása

Az egyes állatok adatait táblázat formájában kell megadni. Minden egyes állat esetében értékelni kell a mitotikus indexet, a kiértékelt, metafázisban lévő sejtek számát, a metafázisban lévő sejtenkénti rendellenességek számát és a szerkezeti kromoszóma-rendellenessége(ke)t mutató sejtek százalékos arányát. Fel kell sorolni a szerkezeti kromoszóma-rendellenességek különböző típusait a számukkal és gyakoriságukkal együtt, kezelt és kontrollcsoportonként. A gapeket, valamint a poliploid sejteket és az endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejteket külön-külön kell feljegyezni. A gapek gyakoriságát a jelentésbe kell foglalni, de általában nem kell szerepeltetni az összes szerkezeti rendellenesség gyakoriságának elemzésében. Ha nincs bizonyíték arra, hogy a két ivar másként reagál, az adatok statisztikai elemzés céljából összevonhatók. Az állati toxicitásra és a klinikai tünetekre vonatkozó adatokat szintén a jelentésbe kell foglalni.

Elfogadhatósági kritériumok

Az alábbi kritériumok határozzák meg a vizsgálat elfogadhatóságát:

a) A párhuzamos negatív kontrollok adatai bevihetők a laboratórium negatív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisába (lásd a 11–14. pontot).

b) A párhuzamos pozitív kontrolloknak vagy értékelési kontrolloknak a pozitív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisban generált válaszokkal összeegyeztethető válaszokat, valamint a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva statisztikailag szignifikáns növekedést kell előidézniük (lásd a 20–21. pontot).

c) A megfelelő számú dózis és sejt elemzésére sor került.

d) A legmagasabb dózis kiválasztására vonatkozó kritériumok összhangban vannak a 25-28. pontban ismertetett kritériumokkal.

Az eredmények értékelése és értelmezése

Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha:

▼M7

a) legalább az egyik kezelt csoport statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a (gapeken kívüli) szerkezeti kromoszóma-rendellenességekkel rendelkező sejtek gyakoriságában a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,

b) a megfelelő trendpróbával történő értékelés arra utal, hogy a növekedés a dózissal összefügg, legalább egy mintavételi időpontban; és

c) ezen eredmények bármelyike a történeti negatív kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértékeken) kívül esik.

Ha egy adott mintavételi időpontban csak a legmagasabb dózis vizsgálatára kerül sor, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha statisztikailag szignifikáns növekedés tapasztalható a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva, és az eredmények a történeti negatív kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértékeken) kívül esnek. A megfelelő statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (13). Dózis-válasz elemzéskor legalább három kezelt dóziscsoportot kell elemezni. A statisztikai vizsgálatoknak az állatot kell kísérleti egységként alkalmazniuk. A kromoszóma-rendellenességek vizsgálatának pozitív eredményei arra utalnak, hogy egy vizsgálati vegyi anyag szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket idéz elő a vizsgált faj csontvelőjében.

Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha valamennyi vizsgált kísérleti körülmény esetén:

a) a kezelt csoportok egyike sem mutat statisztikailag szignifikáns növekedést a (gapeken kívüli) szerkezeti kromoszóma-rendellenességek gyakorisága tekintetében a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,

b) a megfelelő trendpróbával történő értékelés arra utal, hogy egyetlen mintavételi időpontban sincs dózissal összefüggő növekedés,

c) valamennyi eredmény a történeti negatív kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértékeken) belül van, valamint

d) a csontvelő vizsgálati vegyi anyag(ok)nak való expozíciója megtörtént.

A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (13). A csontvelő vizsgálati vegyi anyag(ok)nak való expozíciójára vonatkozó bizonyíték lehet többek között a mitotikus index csökkenése vagy a vizsgálati vegyi anyag(ok) plazmában vagy vérben való előfordulásának mérése. Intravénás beadás esetén az expozícióra vonatkozó bizonyíték nem szükséges. Alternatív esetben az azonos expozíciós út és azonos faj alkalmazásával végzett független vizsgálat során kapott ADME-adatok használhatók a csontvelő-expozíció bizonyítására. A negatív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgálati körülmények mellett a vizsgálati vegyi anyag nem idéz elő szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket a vizsgált fajok csontvelőjében.

Az egyértelműen pozitív vagy egyértelműen negatív válasz igazolása nem követelmény.

Olyan esetekben, ha a válasz nem egyértelműen negatív és nem is egyértelműen pozitív, illetve egy adott eredmény (például kismértékű vagy határesethez közelítő növekedés) biológiai relevanciája megállapításának segítése érdekében az adatokat szakértői véleménnyel és/vagy a már lefolytatott kísérletek további vizsgálataival kell értékelni. Egyes esetekben hasznos lehet több sejt elemzése vagy módosított kísérleti körülmények mellett megismételt kísérlet végrehajtása.

▼M7

Ritka esetekben, még további vizsgálatok után is, az adatok eleve kizárják azt a következtetést, hogy a vizsgálati vegyi anyag pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ezért a végkövetkeztetés szerint a vizsgálat kétértelmű lesz.

A poliploid sejteknek és az endoreduplikált metafázisú sejteknek az összes metafázis közötti gyakoriságát külön-külön kell feljegyezni. A poliploid/endoreduplikált sejtek számának növekedése azt jelezheti, hogy a vizsgálati vegyi anyag potenciálisan gátolhatja a mitotikus folyamatokat vagy a sejtciklus előrehaladását (lásd a 3. pontot).

Vizsgálati jegyzőkönyv

A Vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Összegzés

Vizsgálati vegyi anyag:

— eredet, tételszám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-név, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonossága stb.

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai jellemzik.

A vizsgálati vegyi anyag előkészítése:

— a vivőanyag megválasztásának indoklása;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert;

— a takarmány-, ivóvíz- vagy inhalációs készítmények előkészítése;

— a készítmények analitikai meghatározásai (pl. stabilitás, homogenitás, névleges koncentráció), ha végeznek ilyen meghatározásokat.

Kísérleti állatok:

— a felhasznált faj/törzs és a felhasználásuk indokolása;

— az állatok száma, kora és ivara;

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.;

— az állatok egyedi azonosítására szolgáló módszerek;

— rövid távú vizsgálatok esetében: az egyes állatok tömege a vizsgálat kezdetén és végén; egy hétnél hosszabb vizsgálatok esetében: az egyes állatok testtömege a vizsgálat során és a táplálékfelvételük. A testtömegtartományt, az átlagot és a szórást minden egyes csoportnál meg kell adni.

▼**M7**

Vizsgálati körülmények:

— pozitív és negatív (oldószeres/vivőanyagos) kontrollok;

— a dózisbehatároló vizsgálatból kapott adatok, ha történt ilyen vizsgálat;

— a dózisszintek kiválasztásának indoklása;

— a vizsgálati vegyi anyag előkészítésére vonatkozó részletek;

— a vizsgálati vegyi anyag beadására vonatkozó részletek;

— a beadási út és időtartam indoklása;

— annak ellenőrzésére szolgáló módszerek, hogy a vizsgálati vegyi anyag(ok) elérte-e (elérték-e) az általános keringési rendszert vagy a csontvelőt;

— tényleges dózis (mg/testtömeg kg/nap) a vizsgálati vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjából (ppm) és a fogyasztásból számítva, ha alkalmazható;

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek;

— az eutanázia módja;

— a fájdalomcsillapítás módja (amennyiben alkalmaznak ilyet);

— a kezelési és mintavételi ütemtervek részletes leírása és kiválasztásuk indokolása;

— a tárgylemez preparálásának módszerei;

— a toxicitás mérésére szolgáló módszerek;

— a metafázis-blokkoló vegyi anyag összetétele, koncentrációja, dózisa és a mintavétel előtti beadásának időpontja;

— a minták izolálására és tartósítására alkalmazott eljárások;

— a rendellenességek értékelésének kritériumai;

— az állatonként elemzett, metafázisban lévő sejtek száma, valamint a mitotikus index meghatározása céljából elemzett sejtek száma;

— a vizsgálat elfogadhatóságának kritériumai;

— azok a kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy nem meggyőzőnek tekintendők-e.

Eredmények:

— az állatok állapota a vizsgálati időszak előtt és alatt, beleértve a toxicitás jeleit;

— a mitotikus index minden állat esetében külön-külön megadva;

— a rendellenességek és a rendellenességet mutató sejtek típusa és száma, minden egyes állat esetében külön-külön megadva;

— a rendellenességek csoportonkénti száma összesen, átlagokkal és szórással;

— a rendellenességeket mutató sejtek csoportonkénti száma átlagokkal és szórással;

— a ploidia változásai, ha észlelhetők, beleértve a poliploid és/vagy endoreduplikált sejtek gyakoriságát;

▼M7

— a dózis-válasz összefüggés, ahol lehetséges;

— az alkalmazott statisztikai elemzések és módszer;

— a csontvelő expozícióját alátámasztó adatok;

— a párhuzamos negatív és pozitív kontrollokra vonatkozó adatok, a tartományok, az átlag és a szórás megadásával;

— a történeti negatív és pozitív kontrolladatok, a tartományok, az átlagok és a szórás, az eloszlásra vonatkozó 95 %-os ellenőrzési határértékek, valamint a tárgyidőszak és a megfigyelések számának megadásával;

— a pozitív vagy a negatív válasz esetén teljesített kritériumok.

Az eredmények tárgyalása.

Következtetés.

Hivatkozások.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Adler, I.D. (1984), „Cytogenetic Tests in Mammals”, in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.

(3) Preston, R.J. *et al.* (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, pp. 157-165.

(4) Richold, M. *et al.* (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays”, in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

(5) Tice, R.R. *et al.* (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, pp. 305-312.

(6) Adler, I.D. *et al.* (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, pp. 19-30.

(7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(8) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(9) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.

(10) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼**M7**

(11) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.

(12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, pp. 147-163.

(13) Lovell, D.P. *et al.* (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays”, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

▼M7

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Aneuploidia: a normális diploid (vagy haploid) kromoszómaszámtól egyetlen kromoszómával vagy egynél több, szám feletti kromoszómával, de nem teljes kromoszómakészlet(ek) többszöröződésével (lásd a poliploidiát) való bármely eltérés.

Centroméra: olyan kromoszóma-régió(k), amely(ek)hez a sejtosztódás során orsórostok kötődnek, lehetővé téve a leánykromoszómáknak az utódsejtek pólusai felé irányuló szabályos mozgását.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Kromatid típusú rendellenesség: olyan szerkezeti kromoszómakárosodás, amely a különálló kromatidok törésében vagy a kromatidok törésében és újraegyesülésében nyilvánul meg.

Kromoszóma típusú rendellenesség: olyan szerkezeti kromoszómakárosodás, amely a két kromatid azonos helyén történt törésében, vagy törésben és újraegyesülésben nyilvánul meg.

Endoreduplikáció: az a folyamat, amely során valamely DNS-replikáció S fázisát követően a sejtmag nem lép be a mitózis fázisába, hanem egy másik S fázist indít. Az eredmény 4, 8, 16, … kromatiddal rendelkező kromoszómák létrejötte.

Gap: egyetlen kromatid szélességénél kisebb és a kromatidok minimális átrendeződését okozó akromatikus sérülés.

Mitotikus index: a mitózisban lévő sejtek és a sejtpopuláció összes sejtjének aránya, amely az adott sejtpopuláció proliferációs állapotának mérőszáma.

Számszerű rendellenesség: a kromoszómák számának eltérése a felhasznált állatokra jellemző normál számértéktől (aneuploidia).

Poliploidia: ellentétben a kromoszómakészlet egy részében jelentkező számszerű változással (lásd az aneuploidiát), a teljes kromoszómakészlet kromoszómaszámának változásával járó számszerű kromoszóma-rendellenesség.

Szerkezeti kromoszóma-rendellenesség: a sejtosztódás metafázisának mikroszkopikus vizsgálata során – deléciókként és fragmensekként, kromoszómán belüli vagy a kromoszómák közötti átrendeződésként – észlelhető változás a kromoszóma szerkezetében.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

▼M7

2. függelék

AZ IVAROK KÖZÖTTI ELTÉRÉSEK KROMOSZÓMA-RENDELLENESSÉGEK *IN VIVO* VIZSGÁLATA SORÁN TÖRTÉNŐ MEGHATÁROZÁSÁRA SZOLGÁLÓ FAKTORIÁLIS KÍSÉRLETTERVEZÉS

A faktoriális kísérlettervezés és annak elemzése

Ebben a kísérlettervezésben legalább 5 hím és 5 nőstény vizsgálatára kerül sor mindegyik koncentrációszintnél, ami legalább 40 állat (20 hím és 20 nőstény, valamint a releváns pozitív kontrollok) felhasználását eredményezi.

A kísérlettervezés, amely az egyszerűbb faktoriális kísérlettervezések egyike, kétirányú varianciaanalízissel egyenértékű, ahol a fő tényezők az ivar és a koncentrációszint. Az adatok számos standard statisztikai szoftvercsomag, például az SPSS, az SAS, a STATA, a Genstat, valamint az R használatával elemezhetők.

Az analízis az adatkészleten belül a variabilitást az ivarok közötti variabilitásra, a koncentrációk közötti variabilitásra, valamint az ivarok és a koncentrációk közötti kölcsönhatáshoz kapcsolódó variabilitásra osztja. Az egyes feltételeket ugyanazon koncentrációnak kitett, az azonos ivarú állatok csoportjain belüli párhuzamos állatok közötti variabilitás becsült értékéhez viszonyítva kell megvizsgálni. A mögöttes módszertanra vonatkozó kimerítő részletek számos statisztikai tankönyvben (lásd a hivatkozásokat) és a statisztikai szoftvercsomagokkal együtt biztosított súgófájlokban is megtalálhatók.

Az analízis az ivar x koncentráció kölcsönhatási feltételnek az ANOVA-táblázatban ([1]) való vizsgálatával folytatódik. Szignifikáns kölcsönhatás hiányában az egyes ivarok vagy az egyes koncentrációszintek közötti értékek kombinálásával érvényes statisztikai vizsgálat végezhető a szintek között, az ANOVA szerinti, csoporton belül összesített variabilitási feltétel alapján.

Az analízis a becsült koncentrációk közötti variabilitás kontrasztokká osztásával folytatódik, ami lehetővé teszi a válaszok lineáris és kvadratikus kontrasztjainak megállapítását valamennyi koncentrációszintnél. Ha az ivar x koncentráció kölcsönhatás szignifikáns, ez a feltétel lineáris x ivar és kvadratikus x ivar kölcsönhatására vonatkozó kontrasztokká osztható. E feltételek arra vonatkozó vizsgálatokat biztosítanak, hogy a koncentráció-válaszok párhuzamosak-e a két ivar esetében, illetve hogy a két ivar különböző választ ad-e.

A csoporton belül összesített variabilitásra vonatkozó becslés felhasználható az átlagok közötti eltérés páronkénti vizsgálatához. Ezek az összehasonlítások elvégezhetők a két ivarra vonatkozó átlagok között és a különböző koncentrációszintekre vonatkozó átlagok között; ilyen például a negatív kontrollok szintjével való összehasonlítás. Amennyiben szignifikáns kölcsönhatás tapasztalható, összehasonlítható a különböző koncentrációk adott ivaron belüli átlaga vagy az ivarok azonos koncentrációnál számított átlaga.

Hivatkozások

Számos olyan statisztikai tankönyv létezik, amely a faktoriális kísérlettervezések elméletét, kialakítását, módszertanát, elemzését és értelmezését tárgyalja, a legegyszerűbb kétfaktoros elemzéstől a kísérlettervezés módszertanában alkalmazott bonyolultabb formákig. Az alábbi nem kimerítő lista. Egyes könyvekben összehasonlítható kísérlettervezésekre vonatkozó kidolgozott példák találhatók, esetenként az analízisek különféle szoftvercsomagok segítségével történő lefuttatásához szükséges kóddal együtt.

([1]) Az általános lineáris modellekhez (General Linear Models; GLM) hasonló modellezési megközelítést alkalmazó statisztikusok az analízist ettől eltérő, de hasonló módon is megközelíthetik, azonban nem feltétlenül vezetik le a számítógépes korszak előtt kidolgozott statisztikaszámítás algoritmikus megközelítéseiig visszanyúló, hagyományos ANOVA-táblázatot.

▼**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. EMLŐS ERITROCITA MIKRONUKLEUSZ-VIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 474. vizsgálati iránymutatásában (2014) leírt módszerrel. E vizsgálati módszer a genetikai toxikológiai vizsgálati módszerek sorozatának részét képezi. Kidolgozásra került egy, a genetikai toxikológiai vizsgálatokról tömör tájékoztatást nyújtó, a vizsgálati iránymutatások közelmúltbeli változásait áttekintő OECD-dokumentum (1).

Az emlősökön végzett *in vivo* mikronukleusz-vizsgálat azért különösen releváns a genotoxicitás értékelése szempontjából, mert az *in vivo* metabolizmus tényezői, a farmakokinetikai és a DNS-reparációs folyamatok – jóllehet fajonként eltérnek – aktívak és hozzájárulnak a reakciókhoz. Az *in vivo* vizsgálat valamely *in vitro* rendszer által kimutatott genotoxicitás további vizsgálatához is hasznos.

Az emlősökön végzett *in vivo* mikronukleusz-vizsgálat a vizsgálati vegyi anyag által a kromoszómákban vagy az eritroblasztok mitiotikus rendszerében előidézett károsodás kimutatására használatos. A vizsgálat az állatok, rendszerint rágcsálók csontvelőjéből vagy perifériás vérsejtjeiből vett mintákban található eritrocitákon belüli mikronukleusz-képződést értékeli.

A mikronukleusz-vizsgálat célja a visszamaradó kromoszómatöredékeket vagy egész kromoszómákat tartalmazó mikronukleuszok kialakulását eredményező citogenetikai károsodást okozó vegyi anyagok meghatározása.

Amikor a csontvelői eritroblasztból éretlen eritrocita (néha más néven polikromáziás eritrocita vagy retikulocita) fejlődik ki, a fő sejtmag kilökődik, a már esetlegesen létrejött mikronukleuszok hátramaradhatnak a citoplazmában. E sejtekben a fő sejtmag hiánya miatt könnyebb a mikronukleuszok láthatóvá tétele vagy kimutatása. A kezelt állatokban a mikronukleált éretlen eritrociták gyakoriságának növekedése az előidézett szerkezeti vagy számszerű kromoszóma-rendellenességekre utal.

Az újonnan kialakult mikronukleált eritrociták azonosítására és számszerűsítésére megfestéssel kerül sor, melyet mikroszkóp segítségével végzett vizuális értékelés vagy automatizált elemzés követ. Az ivarérett állatok perifériás vérében vagy csontvelőjében lévő elegendő éretlen eritrocita megszámlálását jelentős mértékben megkönnyíti az automatizált értékelési platformok használata. Ezek a platformok a kézi értékelés elfogadható alternatívái (2). Összehasonlító tanulmányokból kiderült, hogy e módszerek a megfelelő kalibráló standardok használatával együtt a kézi mikroszkópos értékelésnél jobb laboratóriumközi és laboratóriumon belüli reprodukálhatóságot és érzékenységet biztosíthatnak (3) (4). A mikronukleált eritrociták gyakoriságának mérésére alkalmas automatizált rendszerek többek között, de nem kizárólag a következők: áramlási citométerek (5), képelemző platformok (6) (7) és lézerszkenneléses citométerek (8).

Bár a vizsgálat keretében általában erre nem kerül sor, a kromoszómatöredékek számos kritérium mentén megkülönböztethetők az egész kromoszómáktól. Ilyen többek között a kinetokor vagy centromer DNS jelenlétének vagy hiányának megállapítása, melyek mindegyike az intakt kromoszómákra jellemző. A kinetokor vagy a centromer DNS hiánya arra utal, hogy a mikronukleusz csak kromoszómatöredékeket tartalmaz, míg a jelenlétük kromoszómaveszteséget jelez.

A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

▼M7

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

Ebben a vizsgálatban a genetikai károsodás vizsgálata szempontjából a fiatal, ivarérett rágcsálók csontvelője a célszövet, mivel az eritrociták ebben a szövetben termelődnek. A perifériás vérben található éretlen eritrocitákban lévő mikronukleuszok mérése elfogadható más olyan emlősfajokban, amelyek esetében az e sejtekben szerkezeti vagy számszerű kromoszóma-rendellenességeket okozó vegyi anyagok kimutatására való megfelelő érzékenység (mikronukleuszok éretlen eritrocitákban való indukciójával) bizonyítást nyert, és amennyiben e választást tudományosan megindokolták. A fő végpont a mikronukleált éretlen eritrociták gyakoriságának meghatározása. A mikronukleuszt tartalmazó érett eritrociták perifériás vérbeli gyakorisága is használható végpontként olyan fajoknál, amelyeknek a lépe nem végez erőteljes kiválasztást a mikronukleált sejtekkel szemben, valamint abban az esetben, ha az állatok folyamatos kezelése az alkalmazott fajokban előforduló eritrocita élettartamát meghaladó ideig tart (pl. egereknél 4 hétig vagy tovább).

Ha létezik arra vonatkozó bizonyíték, hogy a vizsgálati vegyi anyag(ok), vagy annak (azoknak) a metabolitja(i) nem éri(k) el a célszövetet, e vizsgálat alkalmazása nem feltétlenül megfelelő.

A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az állatokat megfelelő módon kell a vizsgálati vegyi anyagnak kitenni. Csontvelő használata esetén az állatokon a kezelés után megfelelő időpont(ok)ban humánus módon eutanáziát kell végrehajtani, a csontvelőt ki kell vonni, preparálni kell és meg kell festeni (9), (10), (11), (12), (13), (14), (15). Perifériás vér használatakor a vért a kezelés után megfelelő időpont(ok)ban össze kell gyűjteni és preparátumokat kell létrehozni, majd meg kell festeni azokat (12), (16), (17), (18). Akut kezelés esetén fontos, hogy a csontvelő vagy a vér összegyűjtésére olyan időpontban kerüljön sor, amikor a mikronukleált éretlen eritrociták kezeléssel összefüggő megjelenése kimutatható. Perifériás vérből történő mintavétel esetén az is követelmény, hogy elegendő idő teljen el ahhoz, hogy ezek a jelenségek előforduljanak a keringő vérben. A preparátumokat mikroszkóp, képelemzés, áramlási citometria vagy lézerszkenneléses citometria segítségével végzett megjelenítéssel kell elemezni a mikronukleuszok jelenléte szempontjából.

A LABORATÓRIUM JÁRTASSÁGÁNAK IGAZOLÁSA

A jártasság vizsgálata

A laboratóriumoknak a vizsgálat rutinszerű alkalmazása előtti, a vizsgálat lefolytatásával kapcsolatos elegendő tapasztalat igazolása érdekében bizonyítottan képesnek kell lenniük a közzétett (például (17) (19) (20) (21) (22) irodalom), a mikronukleusz gyakoriságára vonatkozó adatok alapján várható eredmények reprodukálására legalább két, pozitív kontrollként szolgáló – például az 1. táblázatban felsorolt – vegyi anyaggal (ideértve az alacsony dózisban adagolt pozitív kontrollok által kiváltott gyenge reakciókat is) és kompatibilis vivőanyagos/oldószeres kontrollokkal (lásd a 26. pontot). E kísérletek során olyan dózisokat kell alkalmazni, amelyek reprodukálható és dózissal összefüggő növekedést biztosítanak, továbbá bizonyítják a vizsgálati rendszer érzékenységét és dinamikus tartományát az érintett szövetben (a csontvelőben vagy a perifériás vérben), a laboratóriumon belül alkalmazandó értékelési módszer használatával. Ez a követelmény nem vonatkozik azokra a laboratóriumokra, amelyek tapasztalattal rendelkeznek, azaz amelyeknek a rendelkezésére áll 14–18. pontban meghatározott történeti adatbázis.

Történeti kontrolladatok

A jártassági vizsgálatok során a laboratóriumnak meg kell állapítania a következőket:

— a pozitív kontrollok történeti tartománya és eloszlása, valamint

▼M7

— a negatív kontrollok történeti tartománya és eloszlása.

A negatív kontrollok történeti eloszlásához kapcsolódó első adatgyűjtés során a párhuzamos negatív kontrolloknak összhangban kell lenniük a kontrollokra vonatkozóan közzétett adatokkal, amennyiben léteznek. Amint több kísérleti adat adódik a kontrollok történeti eloszlásához, a párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben az eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük. A laboratórium negatív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisának statisztikailag megbízhatónak kell lennie annak garantálása érdekében, hogy a laboratórium képes legyen ellenőrizni a negatív kontrollra vonatkozó adatok eloszlását. A szakirodalom szerint legalább 10 kísérletre lehet szükség, de az adatbázisnak lehetőség szerint legalább 20, összehasonlítható kísérleti körülmények között végzett kísérletet kell tartalmaznia. A laboratóriumoknak minőségellenőrzési módszereket, például ellenőrzési diagramokat (C-diagramokat vagy X-bar diagramokat (23)) kell alkalmazniuk annak meghatározására, hogy adataik mennyire változóak, valamint annak bizonyítására, hogy náluk a módszertan „ellenőrzés alatt” áll. A történeti adatok összeállításának és felhasználásának módjára (azaz az adatok történeti adatokhoz számításának és azok közül való kizárásának kritériumaira, valamint egy adott kísérlet elfogadhatósági kritériumaira) vonatkozó további ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (24).

Amennyiben a laboratórium nem végez elegendő számú kísérletet a negatív kontrollok statisztikailag megbízható eloszlásának megállapítására (lásd a 15. pontot) a (13. pontban ismertetett) jártassági vizsgálatok során, elfogadható, hogy az eloszlást az első rutinszerű vizsgálatok során határozzák meg. Ennek a megközelítésnek a (24) szakirodalomban foglalt ajánlásokat kell követnie, és az e kísérletek során kapott negatív kontrolleredményeknek továbbra is összhangban kell lenniük a negatív kontrollokra vonatkozóan közzétett adatokkal.

A kísérleti protokoll bármely módosítását meg kell vizsgálni abból a szempontból, hogy milyen hatást gyakorol a létrejött adatoknak a laboratórium meglévő történeti kontrolladatbázisával való összhangjára. Csak jelentősebb következetlenségek fennállása esetén kell új történeti kontrolladatbázist létrehozni, amennyiben szakértői vélemény megállapítja az adatok korábbi eloszlástól való eltérését (lásd a 15. pontot). Az újbóli létrehozás során nem feltétlenül van szükség negatív kontrollokat tartalmazó teljes adatbázisra egy tényleges vizsgálat lebonyolításához, amennyiben a laboratórium bizonyítani tudja, hogy a párhuzamos negatív kontrolljainak értékei továbbra is összhangban lesznek a korábbi adatbázisával vagy a kapcsolódó, közzétett adatokkal.

A negatív kontrollokra vonatkozó adatok a mikronukleált éretlen eritrociták egyes állatokban történő előfordulását jelzik. A párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben a laboratórium negatív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisa szerinti eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük. Amennyiben a párhuzamos negatív kontrollokra vonatkozó adatok a 95 %-os ellenőrzési határértéken kívül esnek, akkor számíthatók be a kontrollok történeti eloszlásába, amennyiben ezek az adatok nem szélsőségesen kiugró értékek, továbbá bizonyíték van arra, hogy a vizsgálati rendszer „ellenőrzés alatt áll” (lásd a 15. pontot), valamint arra, hogy nem áll fenn szakmai vagy emberi mulasztás.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Az állatfaj kiválasztása

Egészséges, fiatal, ivarérett, általánosan használt laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni. Egerek, patkányok vagy más megfelelő emlősfajok használhatók. Perifériás vér használata esetén meg kell állapítani, hogy a mikronukleált sejteknek a lép általi eltávolítása nem veszélyezteti a kiválasztott fajokban indukált mikronukleuszok kimutatását. Ez az egerek és a patkányok perifériás vére tekintetében egyértelműen bizonyítást nyert (2). Patkányoktól és egerektől eltérő fajok használatának tudományos indokolását közölni

▼M7

kell a jelentésben. Rágcsálóktól eltérő fajok használata esetén az indukált mikronukleuszok mérését ajánlatos integrálni egy másik megfelelő toxicitásvizsgálatba.

Az állatok tartásának és etetésének körülményei

Rágcsálók esetében a kísérleti helyiség hőmérsékletének 22 °C (±3 °C)-nak kell lennie. Bár ideális esetben a helyiség relatív páratartalmának 50–60 %-nak kell lennie, legyen legalább 40 %, és a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgálati vegyi anyaggal való megfelelő keveredés szükségessége is befolyásolhatja, ha a vizsgálati vegyi anyag beadása ilyen módon történik. Ha agresszív viselkedés nem várható, a rágcsálókat azonos ivarú és azonos kezelt csoporthoz tartozó kis csoportokban, lehetőleg szilárd aljú, megfelelő környezetgazdagítással ellátott ketrecekben kell tartani (ketrecenként legfeljebb öt egyed tartható). Az állatok kizárólag tudományosan indokolt esetben tarthatók egyenként.

Az állatok előkészítése

Szokásosan egészséges, fiatal, ivarérett állatokat kell alkalmazni (rágcsálók esetén ideális esetben a kezelés kezdetén 6–10 hetes állatokat, bár valamivel idősebb állatok is elfogadhatóak), és azokat véletlenszerűen kontroll- és kezelt csoportokba kell osztani. Az egyes állatokat humánus, minimálisan invazív módszerrel (például gyűrűzéssel, címkézéssel, mikrocsip beültetésével vagy biometrikus azonosítással, de a fül vagy a lábujj kilyukasztása nélkül) egyedi azonosítóval kell ellátni, és legalább öt napig szoktatni kell a laboratóriumi körülményekhez. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek a ketrec elhelyezéséből adódó esetleges hatások. A pozitív kontrollal és a vizsgálati vegyi anyaggal való keresztszennyeződés kerülendő. A vizsgálat kezdetén az állatok tömege közötti eltérésnek minimálisnak kell lennie és nem haladhatja meg az ivaronkénti átlag ± 20 %-át.

A dózisok előkészítése

Az állatoknak történő adagolás előtt a szilárd halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni kell megfelelő oldószerekben vagy vivőanyagokban, vagy bele kell keverni a takarmányba vagy az ivóvízbe. A folyékony vizsgálati vegyi anyagok közvetlenül adagolhatók vagy az adagolás előtt hígíthatók. Belélegzéses expozíció esetén a vizsgálati vegyi anyagok fizikai-kémiai tulajdonságaiktól függően gáz, gőz vagy szilárd/folyadék aeroszol formában adagolhatók. A vizsgálati vegyi anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve akkor, ha a stabilitási adatok bizonyítják a tárolás elfogadhatóságát és meghatározzák a megfelelő tárolási feltételeket.

Vizsgálati körülmények

Oldószer/Vivőanyag

Az oldószer/vivőanyag nem okozhat toxikus hatásokat az alkalmazott dózisok mellett, és nem alkalmazható olyan oldószer/vivőanyag, amely képes kémiai reakcióba lépni a vizsgálati vegyi anyagokkal. Jól ismert oldószerektől eltérő oldószerek/vivőanyagok alkalmazása esetén azok használatát alá kell támasztani a kompatibilitásukat jelző referenciaadatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát ajánlatos megfontolni. Általánosan használt, kompatibilis oldószer/vivőanyag például többek között a víz, a fiziológiás sóoldat, a metilcellulóz oldat, a karboximetil-cellulóz-nátriumsó oldat, az olívaolaj és a kukoricaolaj. Azt igazoló történeti vagy közzétett adatok hiányában, hogy a választott atipikus oldószer/vivőanyag nem idéz elő mikronukleuszokat vagy más ártalmas hatást, kiindulási vizsgálatot kell lebonyolítani az oldószeres/vivőanyagos kontroll elfogadhatóságának megállapítása érdekében.

▼M7

Kontrollok

Pozitív kontrollok

Általában minden vizsgálat során alkalmazni kell olyan állatcsoportot, amelyet pozitív kontrollként szolgáló vegyi anyaggal kezeltek. Ettől el lehet tekinteni, ha a vizsgálólaboratórium bizonyítja a vizsgálat lebonyolításában való jártasságát és megállapítja a pozitív kontrollok történeti tartományát. Párhuzamos pozitív kontrollcsoport hiányában minden egyes kísérletben értékelési kontrollokat (az értékelési módszertől függően megfelelő, fixált és megfestetlen tárgylemezeket vagy sejtszuszpenzió-mintákat) kell alkalmazni. Ezek oly módon kaphatók meg, hogy a vizsgálat értékelésébe beszámítanak a rendszeres időközönként (például 6–18 hónaponként) – például a jártasság vizsgálata során, vagy szükség esetén azt követően rendszeresen – pozitív kontrollokkal végzett különálló kísérlettel létrejött és tárolt megfelelő referenciamintákat.

A pozitív kontrollként szolgáló vegyi anyagoknak megbízható módon ki kell váltaniuk a mikronukleuszok spontán szinthez képest kimutathatóan gyakoribbá válását. Mikroszkóppal végzett kézi értékelés alkalmazásakor a pozitív kontrollok dózisát úgy kell megválasztani, hogy a hatások egyértelműek legyenek, de az értékelő ne tudja beazonosítani azonnal a kódolt mintákat. Elfogadható, hogy a pozitív kontroll beadása a vizsgálati vegyi anyagétól eltérő módon, más kezelési ütemtervvel történjen, és hogy mintavételre csak egyetlen időpontban kerüljön sor. Ezen túlmenően, adott esetben megfontolható a vegyi anyagokkal azonos kémiai osztályba tartozó pozitív kontrollok használata. A pozitív kontrollként szolgáló vegyi anyagokra az 1. táblázat tartalmaz példákat.

1. táblázat

Példák pozitív kontrollként szolgáló vegyi anyagokra

Vegyi anyagok és CASRN
Etil-metánszulfonát [CASRN 62-50-0]
Metil-metánszulfonát [CASRN 66-27-3]
N-etil-N-nitrozo-karbamid [CASRN 759-73-9]
Mitomicin C [CASRN 50-07-7]
Ciklofoszfamid monohidrát [CASRN 50-18-0 (CASRN 6055-19-2)]
Trietilén-melamin [CASRN 51-18-3]
Kolchicin [CASRN 64-86-8] vagy vinblasztin[CASRN 865-21-4] – mint aneugének

Negatív kontrollok

A negatív kontrollcsoport állatait minden mintavételi időpontban figyelembe kell venni, és azokat egyébként a kezelt csoportokkal azonos bánásmódban kell részesíteni, kivéve, hogy nem kapnak kezelést a vizsgálati vegyi anyaggal. Ha a vizsgálati vegyi anyag beadása során oldószert/vivőanyagot alkalmaznak, a kontrollcsoportnak meg kell kapnia ezt az oldószert/vivőanyagot. Ha azonban a vizsgálólaboratórium történeti adatai azt igazolják, hogy a negatív kontrollból származó, mikronukleált sejtek állatok közötti sokfélesége és gyakorisága állandó minden mintavételi időpontban, a negatív kontrollokból elegendő lehet csak egyetlen mintavétel is. Amennyiben a negatív kontrollokhoz egyetlen mintavételt alkalmaznak, azt a vizsgálat során alkalmazott első mintavételi időpontban kell elvégezni.

▼M7

Perifériás vér használata esetén a rövid távú vizsgálatoknál a párhuzamos negatív kontroll helyett elfogadható egy kezelés előtti minta, ha a létrejött adatok összhangban vannak a vizsgálólaboratórium történeti kontrolladatbázisával. Patkányok vonatkozásában beigazolódott, hogy a kezelés előtti kis mennyiségű (például naponta 100 µl-nél kevesebb) mintavétel csekély mértékben befolyásolja a mikronukleusz-háttérgyakoriságot (25).

ELJÁRÁS

Az állatok száma és ivara

A mikronukleusz-válasz általában hasonló a hím- és a nőivarú állatok körében, és ezért a vizsgálatok többsége bármelyik nemnél elvégezhető (26). A hímek és a nőstények közötti lényeges eltéréseket (például a szisztémás toxicitás, a metabolizmus, a biológiai hasznosíthatóság, a csontvelő-toxicitás stb. például többek között dózisbehatároló vizsgálattal megállapított eltéréseit) bizonyító adatok mindkét ivar használatát ösztönöznék. Ebben az esetben helyénvaló lehet mindkét ivarnál vizsgálatot végezni, például ismételt dózisú toxicitási vizsgálat keretében. Mindkét ivar használata esetén helyénvaló lehet a faktoriális kísérlettervezés alkalmazása. Az e kísérlettervezés segítségével végzendő adatelemzés részletei a 2. függelékben találhatók.

A vizsgálat megkezdésekor a csoportok méretét úgy kell megállapítani, hogy csoportonként legalább öt azonos ivarú – illetve mindkét ivar használata esetén mindkét ivarból öt – elemezhető állat legyen. Amennyiben a vegyi anyagoknak való emberi expozíció szexspecifikus lehet, mint például egyes gyógyszerek esetében, a vizsgálatot a megfelelő ivarú állatokkal kell elvégezni. Útmutatás az állatok maximális számára vonatkozó tipikus követelményhez: a 37. pontban megállapított paraméterek szerint, három dóziscsoporttal, valamint párhuzamos negatív és pozitív kontrollcsoportokkal (melyek mindegyike öt, egy ivarhoz tartozó állatból áll) végzett csontvelővizsgálathoz 25-35 állatra lenne szükség.

Dózisszintek

Ha előzetes dózisbehatároló vizsgálatra kerül sor amiatt, hogy már nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok a dózisok kiválasztásának segítéséhez, azt ugyanazon laboratóriumban, ugyanazon fajok, törzsek, ivarok és kezelési eljárások alkalmazásával kell végrehajtani, mint amelyek a fő vizsgálatban alkalmazandóak (27). A vizsgálatnak a maximális tolerálható dózis (MTD) meghatározására kell irányulnia, amely anélkül, hogy vizsgálatkorlátozó toxicitást mutatna, a legmagasabb tolerált dózis a vizsgálati időszak tartamához viszonyítva (például testtömegcsökkenést vagy vérképző rendszeri citotoxicitást vált ki, de elhullást, illetve humánus eutanáziát igénylő, bizonyított fájdalmat, szenvedést vagy szorongást nem idéz elő (28)).

A legmagasabb dózis olyan dózisként is definiálható, amely toxicitást okoz a csontvelőben (például a csontvelőben vagy a perifériás vérben az összes eritrocita között az éretlen eritrociták arányának több mint 50 %-os csökkenését, amely arány ugyanakkor nem lehet kevesebb, mint a kontrollérték 20 %-a). A perifériás vérkeringésben előforduló CD71-pozitív sejtek (például áramlási citometriával végzett) elemzésekor azonban az éretlen eritrociták e nagyon fiatal frakciója gyorsabban reagál a toxikus kihívásokra, mint az éretlen eritrociták nagyobb RNS-pozitív kohorsza. Ezért a toxicitás magasabbnak tűnhet a CD71-pozitív éretlen eritrociták frakcióját vizsgáló akut expozíciós tervek mellett, mint az akut expozíció azon terve szerint, amelynek során az RNS-tartalom alapján történik az éretlen eritrociták azonosítása. Ennélfogva abban az esetben, ha a kísérletek során öt vagy kevesebb kezelési napot alkalmaznak, a toxicitást okozó vizsgálati vegyi anyagok esetében a legmagasabb dózisszint azon dózisként definiálható, amely statisztikailag szignifikáns – a kontrollérték 5 %-ánál alacsonyabbra azonban vissza nem eső – csökkenést okoz a CD71-pozitív éretlen eritrociták összes eritrocitához viszonyított arányában (29).

▼M7

Azok a vegyi anyagok, amelyek a toxikokinetikai tulajdonságok telítődését mutatják, vagy olyan detoxifikációs folyamatokat idéznek elő, amelyek hosszú távú beadás után az expozíció csökkenéséhez vezethetnek, kivételek lehetnek a dózisbeállítási kritériumok alól, és azokat eseti alapon kell értékelni.

Annak érdekében, hogy dózis-válasz adatokat lehessen szerezni, a teljes vizsgálatnak egy negatív kontrollcsoportot, valamint legalább három dózisszintet kell tartalmaznia, ahol a dózisszintek közötti szorzótényező általában 2, de legfeljebb 4. Ha a vizsgálati vegyi anyag nem okoz toxicitást a dózisbehatároló vizsgálat során vagy meglévő adatok alapján, legalább 14 napig tartó beadási időszak esetén a legmagasabb dózisnak 1 000 mg/testtömeg kg/napnak, 14 napnál rövidebb beadási időszak esetében pedig 2 000 mg/testtömeg kg/napnak kell lennie Ha azonban a vizsgálati vegyi anyag toxicitást okoz, az MTD-nek a beadott legmagasabb dózisnak kell lennie, és a használt dózisszintek lehetőleg fedjék le a maximálistól az alacsony mértékű toxicitást okozó vagy toxicitást egyáltalán nem okozó dózisig terjedő tartományt. Ha a célszövet (csontvelő) toxicitása valamennyi vizsgált dózisszintnél megfigyelhető, érdemes nem toxikus dózisoknál további vizsgálatot végezni. A mennyiségi dózis-válasz adatok teljesebb körű jellemzését célzó vizsgálatok további dóziscsoportokat tehetnek szükségessé. Ezek a határértékek a vizsgálati vegyi anyagok bizonyos, külön követelmények hatálya alá tartozó típusai (például a humán gyógyszerek) esetében változóak lehetnek.

Határérték-vizsgálat

Ha a dózisbehatároló kísérletek vagy a rokon állattörzsekből származó meglévő adatok azt jelzik, hogy a legalább a határdózist tartalmazó (az alábbiakban ismertetett) kezelési eljárás semmilyen megfigyelhető toxikus hatást nem vált ki, (többek között nem váltja ki a csontvelősejtek proliferációjának visszaesését vagy a célszövet citotoxicitásának más bizonyítékát), és ha nem várható genotoxicitás az *in vitro* genotoxicitási vizsgálatok alapján vagy a szerkezetileg rokon anyagokra vonatkozó adatok alapján, akkor nem feltétlenül tekintendő szükségesnek három dózis használatával végrehajtott teljes vizsgálat, amennyiben bizonyítást nyert, hogy a vizsgálati vegyi anyag(ok) eléri(k) a célszövetet (a csontvelőt). Ilyen esetekben a határdózisnál alkalmazott egyetlen dózisszint elegendő lehet. Legalább 14 napig tartó beadási időszak esetén a határdózis 1 000 mg/testtömeg kg/nap. 14 napnál rövidebb beadási időszak esetén a határdózis 2 000 mg/testtömeg kg/nap.

A dózisok beadása

Az emberi expozíció várható útját figyelembe kell venni a vizsgálat tervezése során. Ezért az egyéb expozíciós utak (például takarmány, ivóvíz, helyi szubkután, intravénás, orális (gyomorszondával), inhalációs, intratracheális vagy implantáció) is kiválaszthatók indokoltként. Az utat mindenesetre úgy kell kiválasztani, hogy biztosítsa a célszövet(ek) megfelelő expozícióját. A hasüregbe adott injekció nem ajánlott, mivel az nem tervezett emberi expozíciós út, és kizárólag tudományos indokolással alkalmazható. Ha a vizsgálati vegyi anyagot a takarmányba vagy ivóvízbe keverik, különösen egyszeri adagolás esetén ügyelni kell arra, hogy a táplálék és a víz fogyasztása és a mintavétel közötti idő elegendő legyen a hatások kimutathatóságához (lásd a 37. pontot). A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata rendszerint nem haladhatja meg az 1 ml/100 testtömeggramm mennyiséget, kivéve vizes oldatok esetén, amelyeknél legfeljebb 2 ml/100 testtömeggramm használható. Ennél nagyobb mennyiségek használatát meg kell indokolni. A magasabb koncentrációértékeknél rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy maró vizsgálati vegyi anyagok kivételével, a koncentráció megfelelő beállításával minimálisra kell csökkenteni a vizsgálati vegyi anyag mennyiségének eltéréseit, hogy valamennyi dózisszinten a testtömeghez viszonyítva konstans mennyiséget lehessen beadni a kísérleti állatoknak.

▼M7

A kezelés ütemterve

Lehetőleg 2 vagy több kezelést kell 24 órás időközönként végezni, különösen e vizsgálat más toxicitásvizsgálatokba való beépítésekor. Alternatív esetben egyetlen kezelés végezhető, amennyiben tudományosan indokolt (például a vizsgálati vegyi anyagok közismerten blokkolják a sejtciklust). A vizsgálati vegyi anyagok több dózisra osztva is beadhatók, például nagy mennyiségű anyag beadásának megkönnyítése érdekében ugyanazon a napon két vagy több, legfeljebb 2–3 órás időközönként végzett kezeléssel. Ilyen körülmények között, vagy amikor a vizsgálati vegyi anyag beadása inhaláció útján történik, a mintavétel időpontját az utolsó dózis beadásának vagy az expozíció végének időpontja alapján kell ütemezni.

A vizsgálat egereken vagy patkányokon végezhető el az alábbi háromféle mód egyikén:

a. Az állatokat egyszer kell kezelni a vizsgálati vegyi anyaggal. Legalább kétszer kell csontvelőmintákat venni (független állatcsoportokból), a kezelés után 24 óránál nem korábban, de a kezelés utáni 48 órát nem meghaladó időpontban, a minták közötti megfelelő időközzel (időközökkel), kivéve, ha a vegyi anyagról ismert, hogy rendkívül hosszú a felezési ideje. A kezelés utáni 24 óránál korábbi mintavételi idők alkalmazását meg kell indokolni. Legalább kétszer kell perifériás vérmintákat venni (ugyanabból az állatcsoportból), a kezelés utáni 36 óránál nem korábban kezdve, az első mintát követő megfelelő időközzel vagy időközökkel, de 72 órát nem meghaladó időpontban. Az első mintavételi időpontban minden dóziscsoportot kezelni kell, és azokból elemzés céljára mintát kell gyűjteni, a későbbi mintavételi időpont(ok)ban azonban csak a legmagasabb dózist kell beadni. Ha egy mintavétel alkalmával pozitív reakció mutatható ki, további mintavétel nem követelmény, kivéve, ha a dózis-válasz összefüggésre vonatkozó mennyiségi adatokra van szükség. Az ismertetett begyűjtési időpontok a mikronukleuszok e szóban forgó két szövetkamrán belüli megjelenési és eltűnési kinetikájából következnek.

b. Két kezelés(például 24 órás időközzel történő két kezelés) alkalmazása esetén egyszer kell mintákat gyűjteni az utolsó kezelést követő 18 és 24 óra között a csontvelő, és egyszer az utolsó kezelést követő 36 és 48 óra között a perifériás vér vizsgálata esetében (30). Az ismertetett begyűjtési időpontok a mikronukleuszok e szóban forgó két szövetkamrán belüli megjelenési és eltűnési kinetikájából következnek.

c. Három vagy több kezelés (például megközelítőleg 24 órás időközönként három vagy több kezelés) alkalmazása esetén csontvelőmintákat az utolsó kezelés után legkésőbb 24 órával kell venni, a perifériás vért pedig az utolsó kezelés után legkésőbb 40 órával kell begyűjteni (31). Ez a kezelési lehetőség az üstökösvizsgálat (például az utolsó kezelés utáni 2–6 órával történő mintavétel) és a mikronukleusz-vizsgálat ötvözését, valamint a mikronuleusz-vizsgálat és az ismételt dózisú toxicitási vizsgálat ötvözését foglalja magában. Összesített adatok szerint a mikronukleuszok létrejötte ezekben a hosszabb időközökben három vagy több beadást követően figyelhető meg (15).

Releváns és tudományosan indokolt esetben, valamint más toxicitási vizsgálatokba való integráció megkönnyítése érdekében más adagolási vagy mintavételi eljárások is alkalmazhatók.

Megfigyelések

A kísérleti állatok esetében általános klinikai megfigyeléseket kell tenni, és a klinikai tüneteket legalább naponta egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban rögzíteni kell, továbbá figyelembe kell venni az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Az adagolási időszakban naponta legalább kétszer meg kell vizsgálni az összes állatot megbetegedés és elhullás szempontjából. Minden állat tömegét le kell mérni a vizsgálat megkezdésekor, az ismételt dózisú vizsgálatok esetén hetente legalább egyszer, valamint az állatok leölésekor. A legalább egy hétig tartó vizsgálatok során a felvett táplálék mennyiségét legalább heti rendszerességgel le kell mérni. Amennyiben

▼M7

a vizsgálati vegyi anyag beadására az ivóvízzel együtt kerül sor, a vízfogyasztást minden vízcsere alkalmával és legalább hetente le kell mérni. A túlzott toxicitás nem halálos jeleit mutató állatokon a vizsgálati időszak befejeződése előtt humánus módon eutanáziát kell végrehajtani (28). Bizonyos körülmények között az állatok testhőmérsékletét nyomon lehet követni, ugyanis a kezelés által előidézett hiper- és hipotermia közrejátszik a fals eredmények létrejöttében (32) (33) (34).

A célszövet expozíciója

Amennyiben indokolt, és amennyiben más expozíciós adatok nem léteznek (lásd a 48. pontot), megfelelő időpont(ok)ban vérmintát kell venni annak érdekében, hogy a vizsgálati vegyi anyagok plazmában lévő szintjét meg lehessen vizsgálni annak bizonyítása céljából, hogy a csontvelő expozíciója megtörtént.

Csontvelő/vér preparálása

A csontvelősejteket rendszerint az állatok combcsontjából vagy sípcsontjából kell venni közvetlenül a humánus eutanáziát követően. A sejteket általában el kell távolítani, preparálni kell és meg kell festeni bevált módszerek segítségével. Megfelelő állatjóléti előírások szerint kis mennyiségű perifériás vér vehető a kísérleti állat túlélését lehetővé tevő módszer segítségével, például a farokvénából vagy más megfelelő érből történő vérvétellel, szívpunkcióval, vagy az állaton végzett eutanázia alkalmával egy nagy érből történő mintavétellel. Mind a csontvelőből származó eritrociták, mind a perifériás vérből származó eritrociták esetében érvényes, hogy a sejteket – az elemzési módszertől függően – azonnal meg lehet festeni szupravitálisan (16) (17) (18), azokból kenetpreparátumokat kell létrehozni, majd azokat mikroszkópos vizsgálat céljából meg kell festeni, vagy áramlási citometriás elemzés céljából fixálni kell és megfelelően meg kell festeni. A DNS-specifikus festékek (például akridinnarancs (35) vagy Hoechst 33258 plusz pironin-Y (36)) használata kiküszöbölhet néhányat a DNS-re nem jellemző festőanyag használatával mesterségesen előidézett változás közül. Ez az előny nem zárja eleve ki a hagyományos festékek (például mikroszkópos elemzéshez Giemsa) használatát. További rendszerek (például a magvas sejtek eltávolítására szolgáló cellulózoszlopok (37) (38)) is használhatók, feltéve, hogy már bebizonyosodott e rendszerekről, hogy kompatibilisek a laboratóriumi mintapreparálással.

Amennyiben e módszerek alkalmazandóak, kinetokor elleni antitestek (39), fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) végzett pancentromérás DNS-próbák (40), vagy pancentroméra-specifikus primerekkel végzett in situ jelölés megfelelő DNS-kontrasztfestéssel (41) alkalmazható a mikronukleuszok jellegének (kromoszóma/kromoszómatöredék) azonosítására annak meghatározásához, hogy a mikronukleusz-indukálási mechanizmus klasztogén vagy aneugén aktivitásnak tudható-e be. A klasztogén és aneugén hatású anyagok megkülönböztetésére egyéb, korábban hatékonynak bizonyult módszerek is alkalmazhatók.

Elemzés (kézi és automatizált)

Az elemzésre szánt összes tárgylemezt és mintát, beleértve a pozitív és a negatív kontrollokét is, egyedi kódolással kell ellátni, és azokat véletlenszerűen kell kiválasztani bármilyen elemzés előtt, hogy a kézi értékelést végző személy ne ismerje a kezelés körülményeit; ilyen kódolás a nem szemrevételezéses vizsgálaton alapuló és a kezelő személy általi torzítással nem érintett automatizált értékelési rendszerek használatakor nem szükséges. Minden egyes állatnál meg kell határozni az összes (éretlen + érett) eritrocitához viszonyítottan az éretlenek arányát, csontvelő esetében összesen legalább 500 eritrocita, perifériás vér esetében pedig legalább 2 000 eritrocita megszámlálásával (42). Állatonként legalább 4 000 éretlen eritrocitát kell pontozni a mikronukleált éretlen eritrociták előfordulásának megállapítása céljából (43). Ha a negatív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázis szerint a mikronukleált éretlen eritrociták gyakoriságának átlagos háttérértéke 0,1 %-nál kevesebb a vizsgálólaboratóriumban, meg kell fontolni további sejtek értékelését. A minták elemzésekor mikroszkópos vizsgálattal végzett értékelés esetén a kezelt állatokban az éretlen eritrociták összes

▼M7

eritrocitához viszonyított aránya nem lehet kevesebb a vivőanyagos/oldószeres kontrollok arányának 20 %-ánál, CD71+ éretlen eritrociták citometriás módszerekkel végzett értékeléskor pedig nem lehet kevesebb a vivőanyagos/oldószeres kontrollok arányának kb. 5 %-ánál (lásd a 31. pontot) (29). Például a mikroszkóppal értékelt csontvelővizsgálatnál, ha az éretlen eritrociták kontrollaránya 50 % a csontvelőben, a toxicitás felső határértéke az éretlen eritrociták 10 %-os aránya lenne.

Mivel a patkánylép elkülöníti és megsemmisíti a mikronukleált eritrocitákat, a patkányok perifériás vérének elemzése során a vizsgálat magas érzékenységének fenntartása érdekében a mikronukleált éretlen eritrociták elemzését érdemes a legfiatalabb frakcióra korlátozni. Automatizált elemzési módszerek alkalmazásakor ezek a legéretlenebb eritrociták az RNS-tartalmuk alapján, vagy a felületükön megjelenő transzferrin receptorok (CD71+) magas szintje alapján határozhatók meg (31). A különböző festési módszerekkel végzett közvetlen összehasonlításból azonban kiderült, hogy kielégítő eredmények kaphatók különféle módszerekkel, beleértve az akridinnaranccsal végzett festést is (3) (4).

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények feldolgozása

Az egyes állatok adatait táblázat formájában kell megadni. Minden egyes állat esetében külön-külön kell feljegyezni a pontozott éretlen eritrociták számát, a mikronukleált éretlen eritrociták számát és az éretlen eritrociták összes eritrocitához viszonyított arányát. Ha egereket kezelnek folyamatosan legalább négy hétig, a mikronukleált érett eritrociták számát és arányát meg kell adni, ha gyűjtöttek ilyen eritrocitákat. Az állati toxicitásra és a klinikai tünetekre vonatkozó adatokat szintén a jelentésbe kell foglalni.

Elfogadhatósági kritériumok

Az alábbi kritériumok határozzák meg a vizsgálat elfogadhatóságát:

a. A párhuzamos negatív kontrollok adatai bevihetők a laboratórium negatív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisába (lásd a 15–18. pontot).

b. A párhuzamos pozitív kontrolloknak vagy értékelési kontrolloknak a pozitív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisban generált válaszokkal összeegyeztethető válaszokat, valamint a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva statisztikailag szignifikáns növekedést kell előidézniük (lásd a 24–25. pontot).

c. A megfelelő számú dózis és sejt elemzésére sor került.

d. A legmagasabb dózis kiválasztására vonatkozó kritériumok összhangban vannak a 30-33. pontban ismertetett kritériumokkal.

Az eredmények értékelése és értelmezése

Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha:

a. legalább az egyik kezelt csoport statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a mikronukleált éretlen eritrocitákkal rendelkező sejtek gyakoriságában a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,

b. a megfelelő trendpróbával történő értékelés arra utal, hogy a növekedés a dózissal összefügg, legalább egy mintavételi időpontban; és

c. ezen eredmények bármelyike a történeti negatív kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértékeken) kívül esik.

▼M7

Ha egy adott mintavételi időpontban csak a legmagasabb dózis vizsgálatára kerül sor, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha statisztikailag szignifikáns növekedés tapasztalható a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva, és az eredmények a történeti negatív kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértékeken) kívül esnek. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (44) (45) (46) (47). Dózis-válasz elemzéskor legalább három kezelt dóziscsoportot kell elemezni. A statisztikai vizsgálatoknak az állatot kell kísérleti egységként alkalmazniuk. A mikronukleusz-vizsgálat pozitív eredményei azt jelzik, hogy a vizsgálati vegyi anyag hatására kialakulnak olyan mikronukleuszok, amelyek a vizsgált fajok eritroblasztjain belüli kromoszómák károsodásának vagy a mitotikus rendszer károsodásának eredményeként jönnek létre. Amennyiben a vizsgálatot a mikronukleuszokon belüli centromérák kimutatása céljával végezték, a centromérát tartalmazó mikronukleuszok (teljes kromoszóma-veszteségre utaló centromer DNS vagy kinetokor) létrejötte azt bizonyítja, hogy a vizsgálati vegyi anyag aneugén.

Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha valamennyi vizsgált kísérleti körülmény esetén:

a. a kezelt csoportok egyike sem mutat statisztikailag szignifikáns növekedést a mikronukleált éretlen eritrociták gyakorisága tekintetében a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,

b. a megfelelő trendpróbával történő értékelés arra utal, hogy egyetlen mintavételi időpontban sincs dózissal összefüggő növekedés,

c. valamennyi eredmény a történeti negatív kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértékeken) belül van, valamint

d. a csontvelő vizsgálati vegyi anyag(ok)nak való expozíciója megtörtént.

A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (44) (45) (46) (47). A csontvelő vizsgálati vegyi anyag(ok)nak való expozíciójára vonatkozó bizonyíték lehet többek között az éretlen eritrociták érett eritrocitákhoz viszonyított arányának csökkenése vagy a vizsgálati vegyi anyag(ok) plazmában vagy vérben való előfordulásának mérése. Intravénás beadás esetén az expozícióra vonatkozó bizonyíték nem szükséges. Alternatív esetben az azonos expozíciós út és azonos faj alkalmazásával végzett független vizsgálat során kapott ADME-adatok használhatók a csontvelő-expozíció bizonyítására. A negatív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgálati körülmények között a vizsgálati vegyi anyag nem idéz elő mikronukleuszokat a vizsgált fajok éretlen eritrocitáiban.

Az egyértelműen pozitív vagy egyértelműen negatív válasz igazolása nem követelmény.

Olyan esetekben, ha a válasz nem egyértelműen negatív és nem is egyértelműen pozitív, illetve egy adott eredmény (például kismértékű vagy határesethez közelítő növekedés) biológiai relevanciája megállapításának segítése érdekében az adatokat szakértői véleménnyel és/vagy a már lefolytatott kísérletek további vizsgálataival kell értékelni. Egyes esetekben hasznos lehet több sejt elemzése vagy módosított kísérleti körülmények mellett megismételt kísérlet végrehajtása.

Ritka esetekben, még további vizsgálatok után is, az adatok eleve kizárják azt a következtetést, hogy a vizsgálati vegyi anyag pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ezért a végkövetkeztetés szerint a vizsgálat kétértelmű lesz.

Vizsgálati jegyzőkönyv

A Vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Összegzés

Vizsgálati vegyi anyag:

— eredet, tételszám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

▼M7

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-név, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonossága stb.

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai jellemzik.

A vizsgálati vegyi anyag előkészítése:

— a vivőanyag megválasztásának indoklása;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert;

— a takarmány-, ivóvíz- vagy inhalációs készítmények előkészítése;

— a készítmények analitikai meghatározásai (pl. stabilitás, homogenitás, névleges koncentráció), ha végeztek ilyen meghatározásokat.

Kísérleti állatok:

— a felhasznált faj/törzs és a felhasználásuk indokolása;

— az állatok száma, kora és ivara;

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.;

— az állatok egyedi azonosítására szolgáló módszerek;

— rövid távú vizsgálatok esetében: az egyes állatok tömege a vizsgálat kezdetén; egy hétnél hosszabb vizsgálatok esetében: az egyes állatok testtömege a vizsgálat során és a táplálékfelvételük. A testtömegtartományt, az átlagot és a szórást minden egyes csoportnál meg kell adni.

Vizsgálati körülmények:

— a pozitív és negatív (vivőanyagos/oldószeres) kontrollok adatai;

— a dózisbehatároló vizsgálatból kapott adatok, ha történt ilyen vizsgálat;

— a dózisszintek kiválasztásának indoklása;

— a vizsgálati vegyi anyag előkészítésére vonatkozó részletek;

— a vizsgálati vegyi anyag beadására vonatkozó részletek;

— a beadási út és időtartam indoklása;

— annak ellenőrzésére szolgáló módszerek, hogy a vizsgálati vegyi anyag(ok) elérte-e (elérték-e) az általános keringési rendszert vagy a célszövetet;

▼M7

— tényleges dózis (mg/testtömeg kg/nap) a vizsgálati vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjából (ppm) és a fogyasztásból számítva, ha alkalmazható;

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek;

— az eutanázia módja;

— a fájdalomcsillapítás módja (amennyiben alkalmaznak ilyet);

— a kezelési és mintavételi ütemtervek részletes leírása és kiválasztásuk indoklása;

— a tárgylemez preparálásának módszerei;

— a minták izolálására és tartósítására alkalmazott eljárások;

— a toxicitás mérésére szolgáló módszerek;

— a mikronukleált éretlen eritrociták értékelésének kritériumai;

— az állatonként elemzett sejtek száma a mikronukleált éretlen eritrociták gyakoriságának meghatározása során, valamint az éretlen eritrociták érett eritrocitákhoz viszonyított arányának megállapítása céljából;

— a vizsgálat elfogadhatóságának kritériumai;

— adott esetben annak meghatározására szolgáló módszerek (például kinetokor elleni antitestek vagy centroméra-specifikus DNS-próbák alkalmazása), hogy a mikronukleuszok teljes kromoszómákat vagy kromoszómatöredékeket tartalmaznak-e.

Eredmények:

— az állatok állapota a vizsgálati időszak előtt és alatt, beleértve a toxicitás jeleit;

— az éretlen eritrociták összes eritrocitához viszonyított aránya;

— a mikronukleált éretlen eritrociták száma, minden egyes állat tekintetében külön megadva;

— csoportonként a mikronukleált éretlen eritrociták átlaga ± szórás;

— a dózis-válasz összefüggés, ahol lehetséges;

— statisztikai elemzések és alkalmazott módszerek;

— az egyidejű negatív és pozitív kontrollokra vonatkozó adatok, a tartományok, az átlagok és a szórás megadásával;

— a történeti negatív és pozitív kontrolladatok, a tartományok, az átlagok és a szórás, az eloszlásra vonatkozó 95 %-os ellenőrzési határértékek, valamint a tárgyidőszak és az adatpontok számának megadásával;

— a csontvelő expozícióját alátámasztó adatok;

— adott esetben azok a jellemzésre szolgáló adatok, amelyek jelzik, hogy a mikronukleuszok teljes kromoszómákat vagy kromoszómatöredékeket tartalmaznak-e;

— a pozitív vagy a negatív válasz esetén teljesített kritériumok.

▼**M7**

Az eredmények tárgyalása.

Következtetés.

Hivatkozások.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Hayashi, M. *et al.* (2007), *in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, pp. 10-30.

(3) MacGregor, J.T. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Vol. 94/1, pp. 92-107.

(4) Dertinger, S.D. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Vol. 94/1, pp. 83-91.

(5) Dertinger, S.D. *et al.* (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, pp. 139-145.

(6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Vol. 370/1, pp. 65-73.

(7) Asano, N. *et al.* (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 404/1-2, pp. 149-154.

(8) Styles, J.A. *et al.* (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, Vol. 44/2, pp. 153-155.

(9) Heddle, J.A. (1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 18/2, pp. 187-190.

(10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, Mutation Research, Vol. 31/1, pp. 9-15.

(11) Heddle, J.A. *et al.* (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 123/1, pp. 61-118.

(12) Mavournin, K.H. *et al.* (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 239/1, pp. 29-80.

(13) MacGregor, J.T. *et al.* (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, Developments in Toxicology Environmental Science, Vol. 11, pp. 555-558.

▼**M7**

(14) MacGregor, J.T. *et al.* (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 189/2, pp. 103-112.

(15) MacGregor, J.T. *et al.* (1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, Fundamental and Applied Toxicology, Vol. 14/3, pp. 513-522.

(16) Hayashi, M. *et al.* (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research/ Genetic Toxicology, Vol. 245/4, pp. 245-249.

(17) CSGMT/JEMS.MMS – The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 278/2-3, pp. 83-98.

(18) CSGMT/JEMS.MMS – The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), Mutagenesis, Vol. 10/3, pp. 153-159.

(19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 23/4, pp. 239-273.

(20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 453/1, pp. 45-50.

(21) Hayes, J. *et al.* (2009), The rat bone marrow micronucleus test–study design and statistical power, Mutagenesis, Vol. 24/5, pp. 419-424.

(22) Wakata, A. *et al.* (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 32/1, pp. 84-100.

(23) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(24) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(25) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 108-120.

(26) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.

(27) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼**M7**

(28) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(29) LeBaron, M.J. *et al.* (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, pp. 222-228.

(30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, Vol. 10/4, pp. 313-319.

(31) Hayashi, M. *et al.* (2000), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, pp. 234-252.

(32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 390/1-2, pp. 79-83.

(33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 413/1, pp. 7-14.

(34) Spencer, P.J. *et al.* (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, pp. 120-127.

(35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 120/4, pp. 241-247.

(36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, pp. 269-275.

(37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 213/1, pp. 91-104.

(38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, Vol. 439/1, pp. 121-126.

(39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, Mutagenesis, Vol. 5/4, pp. 411-415.

(40) Miller, B.M. *et al.* (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, pp. 297-302.

(41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, American Journal of Medical Genetics, Vol. 107/2, pp. 99-104.

(42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Research, Vol. 347/2, pp. 97-99.

(43) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

▼**M7**

(44) Richold, M. *et al.* (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays”, in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

(45) Lovell, D.P. *et al.* (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays”, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

(46) Hayashi, M. *et al.* (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49-52.

(47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 469/2, pp. 233-241.

▼M7

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Centroméra: olyan kromoszóma-régió(k), amely(ek)hez a sejtosztódás során orsórostok kötődnek, lehetővé téve a leánykromoszómáknak az utódsejtek pólusai felé irányuló szabályos mozgását.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Eritroblaszt: az eritrocita fejlődésének az éretlen eritrocitát közvetlenül megelőző korai szakasza, amikor a sejt még tartalmaz magot.

Kinetokor: az eukarióta sejtek centromérájában kialakuló fehérjeszerkezet, amely a mitózis és a meiózis során összeköti a kromoszómát a mitotikus orsó mikrocsöves polimerjeivel, és amely a sejtosztódás során a testvérkromatidok szétválasztására szolgál.

Mikronukleusz: a sejtek fő magjától elkülönült kis járulékos mag, amelyet a mitózis (meiózis) telofázisa során hoznak létre visszamaradó kromoszómatöredékek vagy teljes kromoszómák.

Normokromáziás vagy érett eritrocita: olyan teljesen érett eritrocita, amely elveszítette az enukleációt követően megmaradó reziduális RNS-ét és/vagy más rövid életű sejtmarkereit, amelyek jellemzően eltűnnek az enukleáció után az utolsó eritroblaszt-osztódást követően.

Polikromáziás vagy éretlen eritrocita: köztes fejlődési szakaszban lévő, újonnan kialakult eritrocita, amely például a Wright–Giemsa elnevezésű klaszszikus vérfesték kék és vörös komponenseivel egyaránt megfestődik az újonnan kialakult sejtben lévő reziduális RNS jelenléte miatt. Ezek az újonnan kialakult sejtek nagyjából azonosak a retikulocitákkal, vitális festék segítségével jelenítődnek meg, amelynek hatására a reziduális RNS retikulummá tömörül. Más módszerek, többek között az RNS fluoreszcens festékekkel történő monokróm festése vagy a CD71-hez hasonló, rövid életű felületi markerek fluoreszcens antitestekkel történő megjelölése jelenleg gyakran használatosak az újonnan kialakult vörösvérsejt azonosítására. A polikromáziás eritrociták, a retikulociták és a CD71-pozitív eritrociták mind éretlen eritrociták, bár mindegyiknek némileg eltérő az életkori eloszlása.

Retikulocita: a reziduális sejt-RNS jellegzetes retikulummá tömörülését okozó vitális festékkel megfestett, újonnan kialakult eritrocita. A retikulociták és a polikromáziás eritrociták egymáshoz nagyon közel álló fejlődési szakaszban vannak.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

▼M7

2. függelék

AZ IVAROK KÖZÖTTI ELTÉRÉSEK MEGHATÁROZÁSÁRA SZOLGÁLÓ FAKTORIÁLIS KÍSÉRLETTERVEZÉS AZ *IN VIVO* MIKRONUKLEUSZ-VIZSGÁLAT SORÁN

A faktoriális kísérlettervezés és annak elemzése

Ebben a kísérlettervezésben legalább 5 hím és 5 nőstény vizsgálatára kerül sor mindegyik koncentrációszintnél, ami legalább 40 állat (20 hím és 20 nőstény, valamint a releváns pozitív kontrollok) felhasználását eredményezi.

A kísérlettervezés, amely az egyszerűbb faktoriális kísérlettervezések egyike, kétirányú varianciaanalízissel egyenértékű, ahol a fő tényezők az ivar és a koncentrációszintek. Az adatok számos standard statisztikai szoftvercsomag, például az SPSS, az SAS, a STATA, a Genstat, valamint az R használatával elemezhetők.

Az analízis az adatkészleten belül a variabilitást az ivarok közötti variabilitásra, a koncentrációk közötti variabilitásra, valamint az ivarok és a koncentrációk közötti kölcsönhatáshoz kapcsolódó variabilitásra osztja. Az egyes feltételeket ugyanazon koncentrációnak kitett, az azonos ivarú állatok csoportjain belüli párhuzamos állatok közötti variabilitás becsült értékéhez viszonyítva kell megvizsgálni. A mögöttes módszertanra vonatkozó kimerítő részletek számos statisztikai tankönyvben (lásd a hivatkozásokat) és a statisztikai szoftvercsomagokkal együtt biztosított súgófájlokban is megtalálhatók.

Az analízis az ivar x koncentráció kölcsönhatási feltételnek az ANOVA-táblázatban ([1]) való vizsgálatával folytatódik. Szignifikáns kölcsönhatás hiányában az egyes ivarok vagy az egyes koncentrációszintek közötti értékek kombinálásával érvényes statisztikai vizsgálat végezhető a szintek között, az ANOVA szerinti, csoporton belül összesített variabilitási feltétel alapján.

Az analízis a becsült koncentrációk közötti variabilitás kontrasztokká osztásával folytatódik, ami lehetővé teszi a válaszok lineáris és kvadratikus kontrasztjainak megállapítását valamennyi koncentrációszintnél. Ha az ivar x koncentráció kölcsönhatás szignifikáns, ez a feltétel lineáris x ivar és kvadratikus x ivar kölcsönhatására vonatkozó kontrasztokká osztható. E feltételek arra vonatkozó vizsgálatokat biztosítanak, hogy a koncentráció-válaszok párhuzamosak-e a két ivar esetében, illetve hogy a két ivar különböző választ ad-e.

A csoporton belül összesített variabilitásra vonatkozó becslés felhasználható az átlagok közötti eltérés páronkénti vizsgálatához. Ezek az összehasonlítások elvégezhetők a két ivarra vonatkozó átlagok között és a különböző koncentrációszintekre vonatkozó átlagok között; ilyen például a negatív kontrollok szintjével való összehasonlítás. Amennyiben szignifikáns kölcsönhatás tapasztalható, összehasonlítható a különböző koncentrációk adott ivaron belüli átlaga vagy az ivarok azonos koncentrációnál számított átlaga.

Hivatkozások

Számos olyan statisztikai tankönyv létezik, amely a faktoriális kísérlettervezések elméletét, kialakítását, módszertanát, elemzését és értelmezését tárgyalja, a legegyszerűbb kétfaktoros elemzéstől a kísérlettervezés módszertanában alkalmazott bonyolultabb formákig. Az alábbi nem kimerítő lista. Egyes könyvekben összehasonlítható kísérlettervezésekre vonatkozó kidolgozott példák találhatók, esetenként az analízisek különféle szoftvercsomagok segítségével történő lefuttatásához szükséges kóddal együtt.

([1]) Az általános lineáris modellekhez (General Linear Models; GLM) hasonló modellezési megközelítést alkalmazó statisztikusok az analízist ettől eltérő, de hasonló módon is megközelíthetik, azonban nem feltétlenül vezetik le a számítógépes korszak előtt kidolgozott statisztikaszámítás algoritmikus megközelítéseiig visszanyúló, hagyományos ANOVA-táblázatot.

▼**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. **MUTAGENITÁS: REVERZ MUTAGENITÁSI VIZSGÁLAT BAKTÉRIUMOKKAL**

1. **MÓDSZER**

E módszer megfelel az OECD TG 471-nek, reverz mutagenitási vizsgálat baktériumokkal (1997).

1.1. BEVEZETÉS

A bakteriális reverz mutagenitás vizsgálat a *Salmonella typhimurium* és *Escherichia coli* aminosavat igénylő törzseit használja pontmutációk észlelésére, amelyek magukban foglalják egy vagy néhány DNS bázispár szubsztitúcióját, addícióját vagy delícióját (1), (2), (3). E bakteriális reverz mutagenitás vizsgálatnak az az elve, hogy észleli azon mutációkat, amelyek revertálják a kísérleti törzsekben jelen lévő mutációkat, és helyreállítja a baktériumoknak egy esszenciális aminosavat szintetizáló képességét. A revertált baktérium észlelése azon képességének a segítségével történik, hogy az növekedni tud, amikor nincs jelen a vizsgálati anyatörzs által igényelt aminosav.

A pontmutációk sok emberi genetikai betegség okozói, és számos bizonyíték van arra, hogy a testi sejtek onkogénjeinek és tumorszuppresszor génjeinek a pontmutációi szerepet játszanak a daganat képződésben emberekben és kísérleti állatokban. A reverz mutáció vizsgálatot baktériumokkal gyors, olcsó és viszonylag könnyű végrehajtani. E törzsek közül sok törzs rendelkezik néhány olyan jellemzővel, amelyek érzékenyebbekké teszik azokat mutációk észleléséhez; ilyenek a reverzió helyének DNS-szekvenciája, nagyobb molekulák iránti fokozott sejtpermeabilitás, bizonyos DNS-reparációs rendszerek kiiktatása, vagy a hibára hajlamos DNS-reparációs folyamatok serkentése. A kísérleti törzsek sajátossága néhány hasznos információt szolgáltathat a genotoxikus anyagok által előidézett mutációk típusairól. Szerkezetek sokféle változatához kapott eredmények bő adatbázisa áll rendelkezésre baktériális reverz mutagenitás vizsgálatokhoz; jól megalapozott metodikákat fejlesztettek ki különböző fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező kémiai anyagok, beleértve az illékony vegyületeket is, vizsgálatához.

Lásd még az Általános bevezetés B. részét is.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

A reverz mutagenitás vizsgálat vagy *Salmonella typhimurium*-mal vagy *Escherichia coli*-val elvégezve, azon mutációkat igazolja, amelyek valamely aminosavat (hisztidin, illetve triptofán) igénylő törzsben lépnek fel és egy olyan törzs kialakulásához vezetnek, ami a külső aminosav-ellátástól független.

Bázispárcserét okozó mutagének azok a hatóanyagok, amelyek alapvető bázisváltozást okoznak a DNS-ben. A reverziós vizsgálatban e változás az eredeti mutáció helyén vagy a baktériumgenom egy másik helyén.

Frameshift mutagének azok a hatóanyagok, amelyek egy vagy több bázispár addícióját vagy delícióját okozzák a DNS-ben, ezzel megváltoztatva a leolvasó keretet a ribonukleinsavban.

▼B

1.3. ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

A bakteriális reverz mutagenitás vizsgálat prokarióta sejteket használ, amelyek az olyan tényezőkben térnek el az emlőssejtektől, mint például a kémiai anyagok felvétele, metabolizmus, kromoszómaszerkezet és DNS-reparációs folyamatok. Az *in vitro* végrehajtott vizsgálatok rendszerint a metabolikus aktiválás valamilyen kívülről ható forrásának használatát teszik szükségessé. Az *in vitro* metabolikus aktiváló rendszerek nem tudják teljesen szimulálni az emlős *in vivo* körülményeket. Ebből következően a vizsgálat nem ad közvetlen tájékoztatást az emlősök esetében valamely anyag mutációt előidéző és daganatkeltő potenciáljáról.

A bakteriális reverz mutagenitás vizsgálatot rendszerint a genotoxikus aktivitás és különösen a pontmutáció-előidéző aktivitás első szűrőjeként alkalmazzák. A terjedelmes adatbázis bebizonyította, hogy sok olyan kémiai anyag, amely e vizsgálatban pozitívnak bizonyult, más vizsgálatokban is mutagénnek bizonyul. Léteznek példák olyan mutációt előidéző hatóanyagokra, amelyeket nem észlel e vizsgálat; e hiányosságok okai a vizsgált végpont különleges természetének, a metabolikus aktiválásban előforduló különbségeknek, vagy a biológiai elérhetőségben lévő különbségeknek tulajdoníthatók. Másrészről, azon tényezők, amelyek növelik a bakteriális reverz mutagenitás vizsgálat érzékenységét, a mutagén aktivitás túlbecsléséhez vezethetnek.

A bakteriális reverz mutagenitás vizsgálat lehet, hogy nem bizonyul megfelelőnek bizonyos kémiai anyagosztályok értékeléséhez, ilyenek például az erősen baktericid vegyületek (például bizonyos antibiotikumok) és azok, amelyek vélhetően (vagy bizonyítottan) kifejezetten zavaró hatással vannak az emlőssejt replikációs rendszerére (például néhány topoizomeráz gátló szer és néhány nukleozid analóg). Ilyen esetekben megfelelőbbnek bizonyulhatnak az emlős mutagenitási vizsgálatok.

Sok olyan vegyület van, amely pozitív eredményt mutat e vizsgálatban és az emlősökben rákkeltő, a korreláció mégsem abszolút. Mérvadó a kémiai anyag osztálya, és léteznek olyan karcinogén anyagok, amelyeket nem észlel e vizsgálat, mivel azok más, nem genotoxikus mechanizmusokon, vagy olyan mechanizmusokon keresztül fejtik ki a hatásukat, amelyek nincsenek jelen baktériumokban.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Baktériumsejtek szuszpenzióit kezelik a vizsgált anyaggal exogén metabolikus aktiváló rendszer jelenlétében és anélkül. A lemezöntéses (plate incorporation) módszernél e szuszpenziókat közvetlenül be kell keverni a felülöntő agarba, és minimális táptalajra helyezni. Az előinkubációs módszer esetében az expozíciós keveréket inkubálni kell, és csak ezután kell azt bekeverni a felül öntő agarba a minimál táptalajra helyezés előtt. Mindkét módszer alkalmazásakor két vagy három napig tartó inkubálás után meg kell számolni a revertáns telepeket, és össze kell hasonlítani azt az oldószer kontroll-lemeztenyészeteken lévő spontán revertáns telepek számával.

Már több különböző eljárást írtak le a bakteriális reverz mutagenitás vizsgálat végrehajtására. A leggyakrabban használt eljárások közé tartoznak a lemezöntéses módszer (1), (2), (3), (4) az előinkubációs módszer (2), (3), (5), (6), (7), (8) a fluktuációs módszer (9), (10) és a szuszpenziós módszer (11). Már leírtak módosított változatokat gázok vagy gőzök vizsgálatához (12).

▼B

A módszerben leírt eljárások elsősorban a lemezöntéses és az előinkubációs módszerekhez tartoznak. Ezek közül bármelyik alkalmas kísérletek végrehajtására, mind metabolikus aktiválással, mind anélkül. Néhány anyag hatékonyabban észlelhető az előinkubációs módszer segítségével. Ezen anyagok olyan kémiai anyagosztályokhoz tartoznak, amelyek rövid szénláncú alifás nitrozaminokat, kétvegyértékű fémeket, aldehideket, azo festékeket és diazo-vegyületeket, pirrlizidin alkaloidokat, allil és nitrovegyületeket tartalmaznak (3). Azt is felismerték, hogy a mutagének bizonyos osztályai nem mindig észlelhetők az olyan szokásos eljárásokkal, mint például a lemezöntéses vagy előinkubációs módszer. Ezeket „különleges eseteknek” kell tekinteni és észlelésükre alternatív eljárásokat kell használni. A következő „különleges esetek” azonosíthatók (az észlelésükhöz használható eljárásokra adott példákkal együtt): azo festékek és diazo-vegyül etek (3), (5), (6), (13), gázok és illékony kémiai anyagok (12), (14), (15), (16) és glikozidok (17), (18). A standard eljárástól való eltérést tudományosan meg kell indokolni.

1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.5.1. **Előkészületek**

1.5.1.1. *Baktériumok*

Friss baktériumtenyészeteket kell létrehozni a tenyésztés késői logaritmikus vagy korai stacioner fáziséig (körülbelül 10^9 sejt/ml). Késői stacioner fázisban lévő tenyészeteket nem szabad használni. Lényeges, hogy a kísérletben használt tenyészetek nagy arányban tartalmazzanak életképes baktériumokat. Ezt az arányt vagy történeti kontrolladatokból, vagy minden egyes vizsgálatban külön kiszélesztéssel az életképes sejtek számának meghatározásával lehet megadni.

A javasolt inkubációs hőmérséklet 37 °C.

Legalább öt baktériumtörzset kell használni. Ezek közül négy törzs az S. typhinuriumhoz (TA 1535; TA 1537 vagy TA97a vagy TA97; TA98; és TA100) tartozik, amelyekről már bebizonyosodott, hogy megbízhatóan és reprodukálhatóan reagálnak a különböző laboratóriumokban. E négy *S. typhimurium* törzsnek GC bázispárjai vannak a primer reverziós helyen, és ismert, hogy esetleg nem mutatnak ki bizonyos oxidatív mutagéneket, keresztkötő ágenseket és hidrazinokat. Az ilyen anyagok *E. coli* WP2 törzsekkel vagy *S. typhimurium* TA102-vel (19) észlelhetők, amelyek egy AT bázispárral rendelkeznek a primer reverziós helyen. Ezért tehát a következő törzsek kombinációja javasolt:

— S. typhimurium TA 1535, és

— S. typhimurium TA1537 vagy TA97 vagy TA97a, és

— S. typhimurium TA98, és

— S. typhimurium TA100, és

— E. coli WP2 uvrA, vagy E. coli WP2 uvrA (pKM101), vagy S. typhimurium TA102.

A keresztkötő mutagének észleléséhez előnyben részesíthető a TA102 használata, vagy az E. coli-nak egy DNS-reparációban kiválónak bizonyuló törzse (ilyen például az E. coli WP2 vagy E. coli WP2 (pKM10l)) alkalmazása.

▼B

A törzstenyészet elkészítéséhez, az indikátor ellenőrzéséhez és tárolásához elfogadott eljárásokat kell használni. Minden fagyasztott törzstenyészet-készítmény esetében igazolni kell a tenyésztéshez szükséges aminosavat (hisztidin *S. typhimurium* törzsek és triptofán *E. coli* törzsek esetében). Más fenotípus-jellemzőket hasonlóképpen kell ellenőrizni, nevezetesen: R-faktor plazmidok jelenlétét vagy hiányát, ahol szükséges (azaz ampicillin rezisztenciát TA98, TA100 és TA97a vagy TA97, WP2 uvrA és WP2 uvrA (pKM10l) törzsekben és amplicin plusz tetraciklin rezisztenciát TA102-es törzsben); a specifikus mutációk jelenléte (azaz rfa mutáció *S. typhimurium*-ban kristályibolyára való érzékenységen keresztül és uvrA mutáció *E. coli*-ban vagy uvrB mutáció *S. typhimurium*-ban, ibolyántúli fényre való érzékenységen keresztül) (2), (3). A törzseknek a laboratórium történeti kontrolladataiból várt gyakoriság tartományokon belüli és lehetőleg a szakirodalomban közölt tartományon belüli spontán revertáns telep lemeztenyésztési számokat is kell adniuk.

1.5.1.2. *Táptalaj*

Megfelelő minimál agart (például Vogel-Bonner minimál E ingredienseket és glukózt tartalmazót) és hisztidint, biotint vagy tiptofánt tartalmazó felülöntő agart alkalmazunk, azért hogy több sejtosztódást lehessen megfigyelni (1), (2), (9).

1.5.1.3. *Metabolikus aktiválás*

A baktériumot kezelni kell a vizsgált anyaggal, mind megfelelő metabolikus aktiváló rendszer jelenlétében, mind anélkül. A legáltalánosabban használt rendszer a kofaktorral kiegészített posztmitokondriális frakció (S9), amelyet enziminducerrel, ilyen például az Aroclor 1254 (1), (2), vagy a fenobarbiturát és ß-naftoflavon (18), (20), (21) kombinációjával kezelt rágcsálók májából készítették. A poszt-mitokondriális frakciót rendszerint 5-től 30 térfogatszázalékig terjedő koncentrációkban használják az S9-keverékben. Valamely metabolikus aktiváló rendszer kiválasztása és állapota függhet a vizsgálatra kerülő kémiai anyag osztályától. Meghatározott esetekben megfelelőnek bizonyulhat a poszt-mitokondriális felülúszás egynél több koncentrációjának használata. Azofestékek és diazo-vegyületek esetében megfelelőbbnek bizonyulhat valamilyen redukciós metabolikus aktiváló rendszer használata (6) (13).

1.5.1.4. *Vizsgált anyag/előkészítés*

A szilárd vizsgált anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni megfelelő oldószerekben, vagy ha szükséges, hígítani kell a baktérium kezelése előtt. A folyékony vizsgált anyagokat közvetlenül hozzá lehet adni a vizsgált rendszerekhez és/vagy hígíthatók kezelés előtt. Friss készítményeket kell használni, kivéve, ha a stabilitási adatok a tárolás elfogadhatóságát jelzik.

Oldószerként nem alkalmazható olyan anyag, amely gyaníthatóan kémiai reakcióba lép a vizsgált anyaggal, és kompatibilisnek kell lennie a baktérium túlélésével és az S9-es aktivitással (22). Ha a jól ismert oldószertől eltérő oldószereket használnak, ezek használatát alá kell támasztania az összeegyeztethetőségüket jelző adatokkal. Elsőként valamilyen vizes oldószer használatát kell megfontolni. Vízzel instabil anyagok vizsgálatakor a használt szerves oldószereknek vízmenteseknek kell lenniük.

▼B

1.5.2. **Vizsgálati körülmények**

1.5.2.1. *Vizsgált törzsek (lásd az 1.5.1.1. alatt)*

1.5.2.2. *Expozíciós koncentráció*

A vizsgált anyag legnagyobb koncentrációjának meghatározásakor figyelembe veendő kritériumok közé tartozik többek között a citotoxicitás és az oldékonyság a végső keverékben.

Hasznosnak bizonyulhat a toxicitás és az oldékonyság meghatározása egy előzetes kísérletben. A citotoxicitás a revertáns telepek számának csökkenésével, a háttér táptalaj kitisztulásának vagy csökkenésének, vagy a kezelt tenyészetek túlélési rátájának segítségével észlelhető. Valamely anyag citotoxicitása valószínűleg megváltozik metabolikus aktiváló rendszerek jelenlétében. Az oldhatatlanságot a végső keverékben a tényleges vizsgálati körülmények között szabad szemmel látható csapadék képződéseként lehet felismerni.

Oldható, nem citotoxikus anyagok esetében a javasolt maximális kísérleti koncentráció 5 mg/lemez vagy 5 µl/lemez. Az 5 mg/lemeznél vagy 5 µl/lemeznél nem oldódó, nem citotoxikus anyagok esetében egy vagy több kísérleti koncentrációnak nem oldódónak kell lennie a végső keverékben. Azon vizsgált anyagokat, amelyek már 5 mg/lemez vagy 5 ul/lemez alkalmazása esetén citotoxikusak, egészen a citotoxikus koncentrációig kell vizsgálni. A kicsapódás nem zavarhatja az értékelést.

A vizsgált anyag legalább öt különböző elemezhető koncentrációját használják körülbelül fél log-fázis (azaz $\sqrt{10}$) intervallumokkal az első kísérletben. Megfelelőek lehetnek ennél kisebb intervallumok valamilyen koncentráció-hatás viszony vizsgálatakor. Megfontolható 5 mg/lemez, vagy 5 µl/lemez koncentrációt meghaladó vizsgálat jelentős mennyiségű potenciálisan mutagén szennyeződéseket tartalmazó anyagok értékelésekor.

1.5.2.3. *Negatív és pozitív kontrollok*

Minden egyes vizsgálatban egyidejűleg, törzsre jellemző pozitív és negatív (oldószer) kontrollanyagokat alkalmaznak, mind metabolikus aktiválással, mind anélkül. Olyan pozitív kontrollanyag-koncentrációkat kell kiválasztani, amelyek bizonyítják az egyes vizsgálatok hatékonyságát.

Metabolikus aktiváló rendszert alkalmazó vizsgálatok esetében a pozitív kontroll referenciaanyagot (anyagokat) a használt baktériumtörzsek típusa alapján kell kiválasztani.

A következő anyagok példaként szolgálnak a metabolikus aktiválással végrehajtott vizsgálathoz alkalmas pozitív kontrollanyagokra:

CAS-szám	EINECS-szám	Név
781-43-1	212-308-4	9,10- Dimetil-antracén
57-97-6	200-359-5	7,12- Dimetilbenz[a]antracén
50-32-8	200-028-5	Benzo[a]pirén
613-13-8	210-330-9	2-aminoanthracene

▼B

CAS-szám	EINECS-szám	Név
50-18-0		Ciklofoszfamid
6055-19-2	200-015-4	Ciklofoszfamid monohidrát

A következő anyag alkalmas pozitív kontrollanyag reduktív metabolikus aktiváló módszerhez:

CAS-szám	EINECS-szám	Név
573-58-0	209-358-4	Kongó vörös

A 2-Amino-antracént nem szabad használni az S9-es keverék hatékonyságának egyetlen indikátoraként. Ha használunk 2-Amino-antracént, akkor az S9 minden egyes adagját egy olyan mutagénnel is jellemezni kell, amely mikroszómális enzimekkel, ilyen például a Benzo[a]pirén, Dimetil-benzantracén, történő metabolikus aktiválást igényel.

A következő anyagok példák a törzsre jellemző pozitív kontrollanyagokra azon kísérletekben, amelyeket exogén metabolikus aktiváló rendszer nélkül hajtunk végre.

CAS-szám	EINECS-szám	Anyag	Törzs
26628-22-8	247-852-1	Nátrium-azid	TA 1535 és TA 100
607-57-8	210-138-5	2-Nitro-fluorén	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-Amino-akridin	TA 1537, TA 97 és TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 és TA 97a
80-15-9	201-254-7	Kumén-hidro-peroxid	TA 102
50-07-7	200-008-6	Mitomicin C	WP2 uvrA és TA 102
70-25-7	200-730-1	l-etil-3-nitro-l-N-nitrozo-guanidin	WP2, WP2uvrA és WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-nitroquino-line-l -oxide	WP2, WP2uvrA és WP2uvrA(pKM101)
3688-53-7		Furil-furamid (AF2)	Plazmidhordozó törzsek

Használhatók más megfelelő pozitív kontroll referenciaanyagok is. Olyan pozitív kontrollanyagok használatát kell mérlegelni, amelyek ugyanazon kémiai osztályba tartoznak, mint a vizsgált anyag, ha rendelkezésre állnak ilyenek.

A vizsgálatba bevonják a vizsgált anyagot nem tartalmazó, egyedül oldószerből vagy vivőanyagból álló és egyébként a kezelt csoportokkal azonos módon kezelt negatív kontrollanyagokat. Ezenkívül nem kezelt kontrollokat is használnak, kivéve, ha vannak olyan történeti kontrolladatok, amelyek bizonyítják, hogy semmilyen káros vagy mutagén hatást nem idéz elő a kiválasztott oldószer.

▼B

1.5.3. **A kísérlet végrehajtása**

A lemezöntéses módszer (1), (2), (3), (4) esetében metabolikus aktiválás nélkül, rendszerint 0,05 ml vagy 0,1 ml vizsgált oldatot, 0,1 ml friss baktériumtenyészetet (amely körülbelül 10^8 életképes sejtet tartalmaz) és 0,5 ml steril pufferoldatot összekevernek 2,0 ml rétegelt felülöntő agarral. Metabolikus aktiválással végrehajtott vizsgálathoz rendszerint megfelelő mennyiségű posztmitokondriális frakciót (a metabolikus aktiváló keverékben 5-től 30 térfogatszázalékig terjedő tartományban) tartalmazó 0,5 ml metabolikus aktiváló keveréket összekevernek felülöntő agarral (2,0 ml), a baktériummal és vizsgált anyaggal/vizsgált oldattal együtt. Összekeverjük minden egyes kémcső tartalmát, és egy minimális felülöntő agar felületére öntjük. Engedjük, hogy az agar inkubálás előtt megszilárduljon.

Előinkubációs módszer (2), (3), (5), (6) esetében a vizsgált anyagot/vizsgált oldatot előinkubálják a vizsgált törzzsel (körülbelül 10^8 életképes sejtet tartalmaz) és steril pufferoldattal vagy a metabolikus aktiváló rendszerrel (0,5 ml), rendszerint 20 percig vagy ennél hosszabb ideig 30–37 °C hőmérsékleten a felülöntő agarral való összekeverés és minimális agar lemez felületére öntés előtt. Rendszerint 0,05 vagy 0,1 ml vizsgált anyagot/vizsgált oldatot, 0,1 ml baktériumot és 0,5 ml S9 keveréket vagy steril pufferoldatot keverünk 2 ml felülöntő agarhoz. A kémcsöveket levegőztetjük az előinkubálás során rázókészülék segítségével.

A változás megfelelő becsléséhez három lemezt kell használni minden egyes dózisszinten. Ha tudományosan indolkolt, két lemez használata elfogadható. Valamely lemez esetenkénti elvesztése nem szükségképpen érvényteleníti a vizsgálatot.

Gázok vagy illékony anyagok megfelelő módszerekkel, például légmentesen zárt edényekben, vizsgálhatók (12), (14), (15), (16).

1.5.4. **Inkubálás**

Egy adott vizsgálatban részt vevő minden lemezt 37 °C hőmérsékleten 48–-2 órán át inkubálnak. Az inkubációs időtartam után meg kell számolni lemezenként a revertáns telepek számát.

2. **ADATOK**

2.1. EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Az adatokat a lemezenkénti revertáns telepek számaként kell megadni. Mind a negatív (oldószerkontroll és nem kezelt kontroll, ha használatra került) mind a pozitív kontroll-lemezeken lévő revertáns telepek számát is fel kell jegyezni. Meg kell adni az egyes lemezekhez tartozó számokat, lemezenként a revertáns telepek átlagértékét és a standard eltérést a vizsgált anyaghoz és a pozitív és negatív (nem kezelt és/vagy oldószer) kontrollokhoz képest.

A nyilvánvalóan pozitív reakció igazolása nem szükséges. A többféleképpen magyarázható eredményeket további, lehetőleg a kísérleti körülmények módosításával végrehajtott vizsgálattal kell tisztázni. A negatív eredményeket külön kísérletekkel kell megerősíteni. Azon esetekben, ahol nem tekintjük szükségesnek a negatív eredmények megerősítését, meg kell indokolni e döntést. Megfontolandó az utólagos ellenőrző kísérletekben a vizsgált körülmények tartományának kiterjesztése érdekében a vizsgálati paraméterek módosítása. A módosítható vizsgálati paraméterek, többek között a koncentrációfelosztás, a kezelés módszere (lemezöntéses vagy folyadék előinkubációs) és a metabolikus aktiválási körülmények lehetnek.

▼B

2.2. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

Különböző kritériumok léteznek a pozitív eredmény meghatározására, ilyen például a metabolikus aktiváló rendszer használatával vagy anélkül legalább egy törzsben a lemezenkénti revertáns telepek számának koncentrációval kapcsolatos növekedése a vizsgált tartományban és/vagy reprodukálható növekedése egy vagy több koncentráció mellett (23). Először meg kell vizsgálni az eredmények biológiai jelentőségét. Statisztikai módszerek használhatók a vizsgálati eredmények értékelésének elősegítésére (24). Valamely pozitív reagálás tekintetében nem szabad, hogy a statisztikai szignifikancia legyen az egyetlen meghatározó tényező.

E rendszerben nem mutagén anyagnak tekintendő az a vizsgált anyag, amelyhez tartozó eredmények nem elégítik ki a fenti kritériumokat.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ritka esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul az is, hogy az eredmények többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradhatnak tekintet nélkül arra, hogy hány alkalommal ismételjük meg a kísérletet.

A bakteriális reverz mutagenitás vizsgálatból kapott pozitív eredmények azt jelzik, hogy az anyag bázis szubsztitúcióval vagy kereteltolásokkal (frameshift) pontmutációkat idéz elő a *Salmonella typhimurium* és/vagy az *Escherichia coli* génállományában. A negatív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgálati körülmények között a vizsgált anyag nem mutagén a vizsgált fajokban.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés tartalmazza a következő információkat:

Oldószer/vivőanyag:

— az oldószer kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Törzsek:

— használt törzsek,

— sejtek száma tenyészetenként,

— a törzs jellemzői.

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgált anyag lemezenkénti mennyisége (mg/lemez vagy µl/lemez), és a koncentrációnként használt lemezek számának, valamint az alkalmazott dózisok indoklása,

— használt táptalajok,

— metabolikus aktiváló rendszer típusa és összetétele, az elfogadhatósági kritériumot is ideértve,

— kezelési eljárások.

Eredmények:

— toxicitás jelei,

— kicsapódás jelei,

— az egyes lemezek számértékei,

▼B

— lemezenként a revertáns telepek átlagértéke és a standard eltérés,

— dózis-reakció viszony, ahol lehetséges,

— statisztikai elemzések, ha vannak,

— az egyidejűleg elvégzett negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrolladatok, tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel,

— történeti negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrolladatok, tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

(1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res. 31, pp. 347-364

(2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res, 113, pp. 173-215

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C, Nohmi T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994). Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, Mutation Res., 312, pp. 217-233

(4) Kier, L. D., Brusick D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986). The Salmonella typhimurium/Mannalian Microsomal Assay: A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res. 168, pp. 69-240

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer Letters 1, pp. 91-96

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980). Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C, Springer, Berlin-Heidelberg-New-York, pp. 273-285

(7) Gatehouse, D. G, Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster, R. (1980). Bacterial Mutation Assays, in: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61

(8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, J. Food Safety, 8, pp. 167-177

(9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, Mutation Res., 38, pp. 33-42

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161

▼B

(11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of Salmonella typhimurium, Environmental Mutagenesis, 3, pp. 453-465

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, Mutation Rec. 307, pp. 335-344

(13) Prival, M. J., Bell. S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaugham, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, Mutation Res. 136, pp. 33-47

(14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor. T. and Mortelmans, K. (1992). Salmonella Mutagenicity Tests, V. Results from the Testing of 311 Chemicals, Environ. Mol. Mutagen. 19, pp. 2-141

(15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F., Sobels (eds) Elsevier, Amsterdam, pp. 247-258

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M. Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, Environmental Mutagenesis, 9, pp. 421-441

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979). Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in Salmonella typhimurium, Cancer Res., 39, pp. 3780-3782

(18) Tamura, G, Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980). Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinel Flora, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, pp. 4961-4965

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G (1990), Comparison of Salmonella typhimurium TA 102 with Escherichia coli WP2 Tester strains, Mutagenesis, 5, pp. 285-291

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88

(21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G, Gibson, G G, Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 175-177

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, Mutation Res. 88. pp. 343-350

(23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the Salmonella typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation Res. 189, pp. 83-91

▼B

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II, Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65

▼M7

_____

_____

▼M8

B.17. EMLŐSSEJTEKEN HPRT ÉS XPRT GÉNNEL VÉGZETT *IN VITRO* GÉNMUTÁCIÓS VIZSGÁLATOK

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 476. vizsgálati iránymutatásával (2016). A vizsgálati módszereket a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és az állatok kíméletének figyelembevételével rendszeresen felülvizsgálják. A B.17. vizsgálati módszer jelenlegi felülvizsgált változata a vizsgálat csaknem harminc éves alkalmazása során szerzett tapasztalatokat tükrözi, valamint annak a különálló, újonnan kifejlesztett módszernek az eredményeit, amelynek keretében timidin-kináz gén használatával végeznek emlőssejteken *in vitro* génmutációs vizsgálatokat. A B.17. vizsgálati módszer a genetikai toxikológiai vizsgálati módszerek sorozatának részét képezi. Az OECD kidolgozott egy, a genetikai toxikológiai vizsgálatokról tömör tájékoztatást nyújtó, az OECD genetikai toxikológiára vonatkozó vizsgálati iránymutatásainak közelmúltbeli változásait áttekintő dokumentumot (1).

2. Az emlőssejteken végzett *in vitro* génmutációs vizsgálat célja a vegyi anyagok által előidézett génmutációk észlelése. Az e vizsgálatokban használt sejtvonalak forward (előremutató) mutációkat mérnek riportergénekben, konkrétan az endogén hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz génben (Hprt rágcsálósejtekben és HPRT emberi sejtekben; e vizsgálati módszer keretében együttes megnevezésük Hprt-gén és HPRT-vizsgálat) és a xantin-guanin-foszforibozil-transzferáz (gpt) transzgénben (a továbbiakban: XPRT-vizsgálat). A HPRT-és XPRT-mutációvizsgálatok a genetikai események különböző spektrumait észlelik. A HPRT-vizsgálat által észlelt mutációs eseményeken (pl. bázispárok cseréje, leolvasási keret eltolódása, kisebb deléciók és inszerciók) túlmenően a gpt transzgén autoszomális helye lehetővé teheti a nagy mértékű deléciókból és esetlegesen a mitotikus rekombinációból eredő mutációk észlelését, amelyek HPRT-vizsgálattal nem észlelhetők, mivel a Hprt-gén az X kromoszómán helyezkedik el (2) (3) (4) (5) (6) (7). Szabályozási célra jelenleg az XPRT-vizsgálatot a HPRT-vizsgálatnál ritkábban alkalmazzák.

3. Az alkalmazott fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

4. Az *in vitro* végrehajtott vizsgálatok rendszerint külső forrásból származó metabolikus aktiváció alkalmazását teszik szükségessé. Az exogén metabolikus aktivációs rendszer nem utánozza teljesen az *in vivo* körülményeket.

5. Ügyelni kell arra, hogy ne álljanak elő olyan körülmények, amelyek álpozitív – tehát nem a vizsgálati vegyi anyag és a sejt genetikus anyagának közvetlen kölcsönhatásából származó – eredményre (azaz a vizsgálati rendszerrel való esetleges kölcsönhatásra) vezetnének; ilyen körülmény többek között a pH-érték vagy az ozmolalitás változása (8) (9) (10), a tenyészközeg összetevőivel való kölcsönhatás (11) (12) vagy a túlzott mértékű citotoxicitás (13). A 19. pontban meghatározott, ajánlott citotoxicitási felső határértékeket meghaladó citotoxicitás a HPRT-vizsgálat szempontjából túlzott mértékűnek minősül.

▼M8

6. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

A VIZSGÁLAT ELVE

7. Azok a mutáns sejtek, amelyek nem mutatnak Hprt-enzimaktivitást a HPRT-vizsgálatban vagy xprt-enzimaktivitást az XPRT-vizsgálatban, rezisztensek a purinanalóg 6-thioguanin (TG) citosztatikus hatásaival szemben. A Hprt- (a HPRT-vizsgálatban) vagy a gpt -(az XPRT-vizsgálatban) proficiens sejtek érzékenyek a TG-re, ami a celluláris metabolizmus gátlását okozza, és megállítja a további sejtosztódást. Tehát a mutáns sejtek képesek sejtburjánzásra TG jelenlétében, míg a normál sejtek, amelyek (a HPRT-vizsgálatban) Hprt-enzimet vagy (az XPRT-vizsgálatban) gpt-enzimet tartalmaznak, nem képesek erre.

8. Szuszpenzióban vagy egyrétegű (monolayer) tenyészetben növő sejteket megfelelő időtartamig (3–6 órán keresztül) külső forrásból származó metabolikus aktivációval és anélkül (lásd a 14. pontot) kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal, majd a sejtkultúrát átültetik, hogy meghatározzák a citotoxicitást és lehetővé tegyék a fenotípusos expressziót a mutáns kiválasztása előtt (14) (15) (16) (17). A citotoxicitást a relatív túlélés alapján kell meghatározni, ami a közvetlenül a kezelést követően mért és a kezelés során tapasztalt sejtpusztulással kiigazított kolóniaképző képesség összevetve a negatív kontrollal (18. pont és 2. függelék). A kezelt tenyészeteket megfelelő, az egyes sejtvonalakra jellemző ideig tenyészközegben tartják, hogy lehetővé váljon az indukált mutációk közel optimális fenotípusos expressziója (ez általában legalább 7–9 napot igényel). A fenotípus expressziót követően a mutációs gyakoriságot úgy határozzák meg, hogy leültetnek ismert számú sejtet a szelekciós ágenst tartalmazó tápoldatba a mutáns telepek kimutatására, valamint a szelekciós ágenst nem tartalmazó tápoldatba a kolóniaképző képesség (életképesség) meghatározására. Megfelelő inkubációs idő után megszámolják a telepeket. A mutációs gyakoriság kiszámításának alapja a mutáns telepek száma, kiigazítva a mutáns kiválasztásának idején mért kolóniaképző képességgel.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Sejtek

9. A HPRT- és XPRT-vizsgálatokban használt sejttípusoknak bizonyítottan érzékenynek kell lenniük a kémiai mutagén anyagokra, magas kolóniaképző képességgel, stabil kariotípussal és stabil spontán mutációs gyakorisággal kell rendelkezniük. A HPRT-vizsgálatokhoz leggyakrabban használt sejtek közé tartoznak a CHO, CHL és V79-es kínai hörcsög sejtek, az L5178Y egér-limfómasejtek és a TK6-os humán limfoblasztoid sejtek (18) (19). Az XPRT-vizsgálathoz CHO-ból származó AS52-es sejteket használnak, amelyek tartalmazzák a gpt transzgént (és Hprt-génjüket kiütötték) (20) (21); a HPRT-vizsgálat AS52-es sejteken nem végezhető el, mert azok hprt-génjét kiütötték. Más sejtvonalak használatát indokolni és validálni kell.

10. A sejtvonalakat rutinszerűen ellenőrizni kell a modális kromoszómaszám stabilitása és az esetleges mikoplazma-fertőzés szempontjából (22) (23), és a sejtek nem használhatók fel, ha fertőzöttek vagy ha a modális kromoszómaszám megváltozott. A vizsgálólaboratóriumban használt sejtek rendes sejtciklusidejét meg kell állapítani, és annak összhangban kell lennie a közzétett

▼M8

sejtjellemzőkkel. Az induló sejtkészletben is ellenőrizni kell a spontán mutációs gyakoriságot, és a sejteket nem szabad felhasználni, ha a mutációs gyakoriság nem elfogadható.

11. A vizsgálatban való felhasználás előtt a sejtkultúrákat, amennyiben szükséges, meg kell tisztítani a jelen lévő mutáns sejtektől, például HAT-tápfolyadékban történő tenyésztéssel a HPRT-vizsgálatnál, és MPA-tápfolyadékban az XPRT-vizsgálatnál (5) (24) (lásd az 1. függeléket). A megtisztított sejtek fagyasztással tartósíthatók, majd felolvasztva munkakészletként használhatók. Az újonnan felolvasztott munkakészlet azt követően használható fel a vizsgálathoz, hogy elérte szokásos megduplázódási idejét. XPRT-vizsgálat végzésekor a szokásos módon tenyésztett AS52-es sejtek számára olyan körülményeket kell biztosítani, amelyek garantálják a gpt-transzgén fennmaradását (20).

Tápfolyadék és tenyésztési körülmények

12. A tenyészetek fenntartására megfelelő tápfolyadékot és inkubációs feltételeket kell biztosítani (tenyésztőedények, 5 %-os CO2-koncentrációjú, vízgőzzel telített levegő és 37 °C-os inkubációs hőmérséklet). A sejttenyészeteket mindig olyan körülmények között kell tartani, amelyek biztosítják az exponenciális növekedési szakaszt. Különösen fontos a tenyészközeg és a tenyésztési körülmények olyan módon történő megválasztása, hogy azok biztosítsák az optimális növekedési feltételeket az expressziós időszak alatt, valamint azt, hogy mind a vad típusú, mind a mutáns sejtvonalak kolóniaképző képessége optimális legyen.

A tenyészetek előkészítése

13. A sejtvonalakat törzstenyészetekből kell felszaporítani, majd tápfolyadékba leoltani olyan sejtszámmal, hogy a sejtek a szuszpenziókban vagy az egyrétegű tenyészetekben a teljes kezelési és expressziós időszakban exponenciálisan növekedjenek (az egyrétegű tenyészetekben növő sejtek esetében például kerülendő a konfluencia).

Metabolikus aktiválás

14. Nem megfelelő endogén metabolikus képességű sejtek használata esetén exogén metabolikus aktivációs rendszereket kell alkalmazni. A leggyakrabban használt rendszer – amely egyéb indok fennállása hiányában általánosságban ajánlott – a kofaktorokkal kiegészített mitokondriális frakció (S9), amelyet rágcsálók (általában patkány) olyan enzimindukáló reagensekkel kezelt májából izolálnak, mint az Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28), vagy a fenobarbitál és β-naftoflavon kombinációja (29) (30) (31) (32). Ez utóbbi kombináció nem ütközik a környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokról szóló stockholmi egyezménnyel (33), és kimutatták róla, hogy hatékonysága a vegyes funkciójú oxidázok indukálásához az Aroclor 1254-ével megegyező (29) (31). Az S9 frakció jellemzően 1–2 térfogatszázalék koncentrációban használatos, de a végső vizsgálati közegben 10 térfogatszázalékra növelhető. Az alkalmazott exogén metabolikus aktivációs rendszer vagy metabolikus induktor típusának és koncentrációjának megválasztását befolyásolhatja a vizsgált anyagok osztálya (34) (35) (36).

A vizsgálati vegyi anyag előkészítése

15. A szilárd halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagokat a sejtek kezelése előtt megfelelő oldószerrel elő kell kezelni, és szükség esetén hígítani kell (lásd a 16. pontot). A folyékony halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagok közvetlenül hozzáadhatók a vizsgálati rendszerhez és/vagy hígíthatók a vizsgálati rendszer kezelése előtt. A gáz halmazállapotú vagy illékony vizsgálati vegyi anyagokat a standard protokollok megfelelő módosításával, például légmentesen lezárt tenyésztőedényekben történő kezeléssel kell vizsgálni (37) (38). A vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó készítményeket közvetlenül a kezelés előtt kell előállítani, kivéve, ha az anyag tárolás során való stabilitása bizonyított.

▼M8

VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEK

Oldószerek

16. Az oldószert oly módon kell kiválasztani, hogy optimális oldhatóságot biztosítson a vizsgálati vegyi anyagnak, ugyanakkor ne befolyásolja hátrányosan a vizsgálat lebonyolítását, vagyis ne változtassa meg a sejtek növekedését, ne befolyásolja a vizsgálati vegyi anyag integritását, ne lépjen reakcióba a tenyésztőedényekkel, és ne károsítsa a metabolikus aktivációs rendszert. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer (vagy tápfolyadék) használatát érdemes megfontolni. Jól bevált oldószer például a víz és a dimetil-szulfoxid. A szerves oldószerek koncentrációja a végleges kezelési közegben általában ne haladja meg az 1 térfogatszázalékot, a vizes oldószereké (sóoldat vagy víz) pedig a 10 térfogatszázalékot. Nem bevált oldószerek (például etanol vagy aceton) használata esetében a vizsgálati vegyi anyaggal és a vizsgálati rendszerrel való összeegyeztethetőségükre utaló adatokkal kell alátámasztani használatukat és azt, hogy a használt koncentrációnál nem genotoxikusak. Alátámasztó adatok hiányában szükséges nem kezelt kontrollok alkalmazása is (lásd az 1. függeléket) annak bizonyítására, hogy a kiválasztott oldószer nem vált ki káros vagy mutagén hatást.

A citotoxicitás mérése és az expozíciós koncentrációk kiválasztása

17. A vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációjának meghatározása során kerülendő az olyan koncentráció, amely hamis pozitív válaszreakciókat válthat ki, mint például a túlzott citotoxicitást okozó koncentráció (lásd a 20. pontot), a tápfolyadékban történő kicsapódást okozó koncentráció (lásd a 21. pontot), illetve a pH vagy az ozmolalitás jelentős változását okozó koncentráció (lásd az 5. pontot). Ha a vizsgálati vegyi anyag a hozzáadásakor jelentős változást okoz a tenyészközeg pH-jában, a pH a kezelésre szolgáló végleges tenyészközeg pufferelésével kiigazítható, hogy elkerülhetők legyenek a hamis pozitív eredmények és megfelelő tenyésztési feltételeket lehessen fenntartani.

18. A koncentráció kiválasztása a citotoxicitás és egyéb megfontolások alapján történik (lásd a 20–22. pontot). Bár a fő vizsgálatban alkalmazandó koncentrációk jobb meghatározásához egy előzetes vizsgálatban érdemes meghatározni a citotoxicitást, az előzetes vizsgálat nem követelmény. Még ha sor is kerül a citotoxicitás előzetes meghatározására, a fő vizsgálat során minden kultúrára el kell végezni a citotoxicitás mérését. A citotoxicitást a relatív túlélés alapján kell értékelni, amely a közvetlenül a kezelést követően átültetett sejtek kolóniaképző képessége (CE), kiigazítva a kezelés során bekövetkezett sejtpusztulással, majd összevetve a negatív kontrollok (ezek túlélési aránya 100 %-nak tekintendő) kiigazított kolóniaképző képességével (a képletet lásd a 2. függelékben).

19. Legalább négy, az elfogadhatósági kritériumokat (megfelelő citotoxicitás, sejtszám stb.) teljesítő vizsgálati koncentrációt ki kell értékelni (az oldószeres és a pozitív kontrollokon túl). Bár két párhuzamos tenyészet használata ajánlott, az egyes vizsgált koncentrációknál párhuzamos vagy szimpla kezelt tenyészetek használhatók. A független párhuzamos tenyészetekben adott koncentráció mellett kapott eredményeket külön kell dokumentálni, az adatelemzéshez azonban összevonhatók (17). Az alacsony citotoxicitást vagy a citotoxicitás hiányát mutató vizsgálati vegyi anyagok esetében rendszerint megközelítőleg kétszeres-háromszoros koncentrációs intervallumok helyénvalóak. Citotoxicitás esetén a választott vizsgálati koncentrációknak le kell fedniük a citotoxicitást okozó koncentrációtól az azon koncentrációkig terjedő tartományt, ahol mérsékelt vagy alacsony a citotoxicitás, illetve nem jelentkezik citotoxicitás. Számos vizsgálati vegyi anyagnak meredek a koncentráció-válasz görbéje, és annak érdekében, hogy a citotoxicitás teljes tartományát le lehessen fedni, vagy részletesen meg lehessen vizsgálni a

▼M8

koncentráció-válasz összefüggést, szükség lehet egymáshoz közelebbi koncentrációk és négynél több koncentráció használatára, különösen olyan helyzetekben, ahol megismételt kísérlet szükséges (lásd a 43. pontot). Négynél több koncentráció alkalmazásának különösen szimpla tenyészetek alkalmazása esetében lehet jelentősége.

20. Ha a legnagyobb koncentráció a citotoxicitáson alapul, a legmagasabb koncentrációval 10 és 20 % közötti relatív túlélési arányt kell megcélozni. A kizárólag 10 %-os vagy az alatti relatív túlélésnél jelentkező pozitív eredmények kiértékelése során körültekintően kell eljárni (43. pont).

21. A legalacsonyabb oldhatatlan koncentrációnál alacsonyabb koncentrációk mellett nem citotoxikus, nehezen oldható vizsgálati vegyi anyagok esetében a legmagasabb analizált koncentrációnak a vizsgálati vegyi anyaggal történő kezelés végén szemmel vagy inverz mikroszkóp segítségével látható zavarosságot vagy kicsapódást kell okoznia. Még abban az esetben is, ha a citotoxicitás a legalacsonyabb oldhatatlan koncentráció felett jön létre, ajánlatos egyetlen egy, zavarosságot vagy látható kicsapódást okozó koncentrációt vizsgálni, mivel a kicsapódás fals hatásokat eredményezhet. A kicsapódást okozó koncentrációnál ügyelni kell annak biztosítására, hogy a kicsapódás ne zavarja a vizsgálat lebonyolítását. Hasznos lehet a tápfolyadékban való oldhatóság meghatározása a kísérlet előtt.

22. Ha nem figyelhető meg kicsapódás vagy korlátozó citotoxicitás, a legmagasabb vizsgálati koncentrációnak 10 mM-nek, 2 mg/ml-nek vagy 2 µl/ml-nek kell megfelelnie, melyek közül a legalacsonyabb a mérvadó (39) (40). Ha a vizsgálati vegyi anyag nem meghatározott összetételű, például ismeretlen vagy változó összetételű anyag, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok (vagyis úgynevezett ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok (UVCB-k)) (41), környezeti extraktum stb., előfordulhat, hogy kellő citotoxicitás hiányában a legmagasabb koncentrációnak magasabbnak (például 5 mg/ml-nek) kell lennie ahhoz, hogy növekedjen az egyes összetevők koncentrációja. Megjegyzendő azonban, hogy ezek a követelmények eltérőek lehetnek a humán gyógyszerek esetében (42).

Kontrollok

23. Minden kísérleti körülménynél párhuzamos negatív kontrollokat kell használni (lásd a 16. pontot), amelyeknél csak oldószert alkalmaznak a tenyészközegben, és a kezelésük ugyanolyan módon történik, mint a kezelt tenyészeteké.

24. Párhuzamos pozitív kontrollok szükségesek annak igazolására, hogy a laboratórium képes az alkalmazott vizsgálati protokoll feltételei mellett mutagének azonosítására, valamint adott esetben az exogén metabolikus aktivációs rendszer eredményességének igazolására. Pozitív kontrollokra vonatkozó példák az alábbi 1. táblázatban találhatók. Indokolt esetben pozitív kontrollként alternatív anyagok használhatók. Mivel az emlőssejtek genetikai toxicitás szempontjából végzett *in vitro* vizsgálatai kellően szabványosítottak, az exogén metabolikus aktiváló rendszerrel vagy anélkül végzett kezeléseket alkalmazó vizsgálatok elvégezhetők mindössze egy – metabolikus aktiválást igénylő – pozitív kontrollal. Ebben az esetben ezen egyetlen pozitív kontroll válaszreakciója a metabolikus aktiváló rendszer aktivitását és a vizsgálati rendszer reagálóképességét is bizonyítja. Mindegyik pozitív kontrollt egy vagy több olyan koncentrációban kell alkalmazni, amely a háttérértékekhez viszonyítva reprodukálható és kimutatható növekedést okoz, hogy bizonyítani lehessen a vizsgálati rendszer érzékenységét, és a választ nem veszélyeztetheti a vizsgálati módszerben meghatározott határértékeket meghaladó citotoxicitás (lásd a 20. pontot).

▼M8

1. táblázat

A laboratóriumok jártasságának értékeléséhez és a pozitív kontrollok kiválasztásához ajánlott referenciaanyagok

Metabolikus aktivációs körülmények	Lókusz	Anyag és CAS-szám
Exogén metabolikus aktiválás nélkül	*Hprt*	Etil-metán-szulfonát [CAS-szám: 62-50-0] Etil-nitrozo-karbamid [CAS-szám: 759-73-9] 4-Nitro-kinolin-1-oxid [CAS-szám: 56-57-5]
	xprt	Sztreptonigrin [CAS-szám: 3930-19-6] Mitomicin-C [CAS-szám: 50-07-7]
Exogén metabolikus aktiválással	*Hprt*	3-Metil-kolantrén [CAS-szám: 56-49-5] 7,12-Dimetil-benzantracén [CAS-szám: 57-97-6] Benzo[a]pirén [CAS-szám: 50-32-8]
	xprt	Benzo[a]pirén [CAS-szám: 50-32-8]

ELJÁRÁS

Kezelés a vizsgálati vegyi anyaggal

25. A proliferáló sejteket metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és hiányában kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal. Az expozíciónak megfelelő időtartamig kell tartania (ez rendszerint 3–6 óra).

26. Az egyes vizsgálati (kontroll és kezelt) tenyészetekhez a vizsgálat bármely szakaszában alkalmazott minimális sejtszámnak a spontán mutációs gyakoriságon kell alapulnia. Általános iránymutatásként annyi sejtet kell kezelni és passzálni, amely elegendő ahhoz, hogy a vizsgálat minden szakaszában valamennyi tenyészetben előforduljon 10 spontán mutáció (17). A spontán mutációs gyakoriság rendszerint 5 és 20 × 10^{-6} közé esik. Az 5 × 10^{-6} spontán mutációs gyakoriság érdekében, valamint hogy biztosítani lehessen a spontán mutációk megfelelő számát (10 vagy több), még a kezelés során 90 %-os citotoxicitást (10 %-os relatív túlélést) okozó koncentrációk mellett kezelt tenyészetek esetében is legalább 20 × 10^{6} sejt kezelése szükséges. Emellett az expressziós időszak során elegendő számú (2 milliónál soha nem kevesebb) sejtet kell tenyészteni majd leültetni a mutáns kiválasztásához (17).

A fenotípusos expresszió ideje és a mutációs gyakoriság mérése

27. A kezelési időszak után a sejteket tovább kell tenyészteni, hogy a mutáns fenotípus kifejlődhessen. Általában 7–9 nap elegendő a frissen indukált Hprt- és xprt-mutánsok közel optimális fenotípusos expressziójához (43) (44). Ezen időszak alatt a sejteket az exponenciális növekedésük fenntartása érdekében rendszeresen át kell ültetni. A fenotípusos expressziót követően a sejteket újból leültetik a szelekciós ágenst (6-tioguanint) tartalmazó, illetve szelekciós ágens nélküli tápfolyadékba, hogy a kiválasztás időpontjában meg lehessen határozni a mutánsok számát, illetve a kolóniaképző képességet. A leültetés egyrétegű tenyészetek esetében végezhető tenyésztőedényekben, vagy sejtszuszpenzió esetén mikrotiter lemezeken. A mutánsok kiválasztásához a sejteket olyan sűrűségben kell átültetni, amely biztosítja a mutánsok optimális kinyerését (azaz elkerülhetővé teszi a metabolikus együttműködést) (17). A lemezeket a telepek optimális növekedését lehetővé tévő ideig (pl. 7–12 napig) inkubálni kell, és meg kell számolni a telepeket. A mutációs gyakoriság kiszámításának alapja a mutáns telepek száma, kiigazítva a mutánsok kiválasztásának idején mért kolóniaképző képességgel (a képleteket lásd a 2. függelékben).

▼M8

A laboratórium jártassága

28. A laboratóriumoknak a vizsgálat rutinszerű alkalmazása előtti elegendő tapasztalat igazolása érdekében kísérletsorozatot kell végrehajtaniuk referenciaként szolgáló, különböző mechanizmussal ható pozitív anyagokkal (legalább egy metabolikus aktiválással és legalább egy metabolikus aktiválás nélkül ható, az 1. táblázatban felsoroltak közül kiválasztott anyaggal), és különböző negatív kontrollokkal (különféle oldószerek/vivőanyagok használatával). E pozitív és negatív kontrollok válaszreakcióinak összhangban kell lenniük a szakirodalommal. Ez nem vonatkozik azokra a laboratóriumokra, amelyek tapasztalattal rendelkeznek, azaz amelyeknek a rendelkezésére áll a 30–33. pontban meghatározott, történeti adatokat tartalmazó adatbázis.

29. A pozitív kontrollként kiválasztott anyagokat (lásd a 25. pontban szereplő 1. táblázatot) metabolikus aktiválás nélkül és metabolikus aktiválással is meg kell vizsgálni a laboratórium mutagén hatású vegyi anyagok kimutatásában és a metabolikus aktivációs rendszer hatékonyságának meghatározásában való jártasságának bizonyítására, valamint be kell mutatni, hogy a laboratórium megfelelően végzi a kezelés alatt a sejttenyésztést, a fenotípusos expressziót és a mutánsok kiválasztását, továbbá, hogy a kiértékelési eljárások is megfelelőek. A vizsgálati rendszer érzékenységének és dinamikus tartományának bizonyítása érdekében a kiválasztott anyagok koncentrációtartományát úgy kell megválasztani, hogy reprodukálható és koncentrációval összefüggő növekedést biztosítson a háttérértékekhez viszonyítva.

Történeti kontrolladatok

30. A laboratóriumnak meg kell állapítania a következőket:

— a pozitív történeti kontrollok tartománya és eloszlása,

— a negatív (nem kezelt, oldószeres) történeti kontrollok tartománya és eloszlása.

31. A negatív történeti kontrollok eloszlásához kapcsolódó első adatgyűjtés során a párhuzamos negatív kontrolloknak összhangban kell lenniük a kontrollokra vonatkozóan közzétett adatokkal (22). Amint több kísérleti adat is felvételre kerül a kontrollok eloszlásához, a párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben az eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük (17) (45) (46).

32. A laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisát első lépésként legalább 10 kísérlettel kell kiépíteni, de az adatbázisnak lehetőség szerint legalább 20, összehasonlítható kísérleti körülmények között végzett kísérletet kell tartalmaznia. A laboratóriumoknak minőségellenőrzési módszereket, például ellenőrzési diagramokat (C-diagramokat vagy X-bar diagramokat (47)) kell alkalmazniuk annak meghatározására, hogy a pozitív és a negatív kontrollokra vonatkozó adataik mennyire változóak, valamint annak bizonyítására, hogy a laboratóriumukban a módszertan „ellenőrzés alatt” áll (46). A történeti adatok összeállításának és felhasználásának módjára (azaz az adatok történeti adatok közé történő felvételének és azok közül való kizárásának kritériumaira, valamint egy adott kísérlet elfogadhatósági kritériumaira) vonatkozó további ajánlások a szakirodalomban találhatók (45).

33. A negatív kontrollokra vonatkozó adatoknak tartalmazniuk kell a szimpla tenyészetből vagy lehetőség szerint a párhuzamos tenyészetekből származó mutációs gyakoriságot, ahogyan az a 23. pontban szerepel. A párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben a laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisa szerinti eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük (17) (45) (46). Amennyiben a párhuzamos negatív kontrollokra vonatkozó adatok a 95 %-os ellenőrzési határértéken kívül esnek, akkor számíthatók be a kontrollok történeti eloszlásába, ha ezek az adatok nem szélsőségesen kiugró értékek, továbbá bizonyíték van arra, hogy a vizsgálati rendszer „ellenőrzés alatt áll” (lásd fent), valamint arra, hogy nem áll fenn szakmai vagy emberi mulasztás.

▼M8

34. A kísérleti protokoll bármely módosítását meg kell vizsgálni abból a szempontból, hogy összhangban van-e a laboratórium meglévő történeti kontrolladatbázisaival. Jelentősebb következetlenségek fennállása esetén új történeti kontrolladatbázist kell létrehozni.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az eredmények értékelése

35. Az eredmények értékelésének tartalmaznia kell a (relatív túlélési arányban kifejezett) citotoxicitás kiszámításához szükséges valamennyi adatot. Az adatoknak mind a kezelt, mind a kontrolltenyészetek esetén magukban kell foglalniuk a kezelés végén mért sejtszámot, a közvetlenül a kezelés után átültetett sejtek számát és a telepek számát (illetve mikrotiter módszer használata esetén a telepet nem tartalmazó lyukak számát). Az egyes tenyészetek relatív túlélését a párhuzamos oldószeres kontrollhoz viszonyított százalékarányban kell kifejezni (a fogalommeghatározásokat lásd az 1. függelékben).

36. Az eredmények bemutatásának tartalmaznia kell ezenfelül a mutációs gyakoriság kiszámításához szükséges valamennyi adatot. A kezelt tenyészetekre és a kontrolltenyészetekre vonatkozó adatoknak ki kell terjedniük: (1) a szelekciós ágenssel és anélkül leültetett sejtek számára (a mutánsok kiválasztása céljából történő leültetés időpontjában), valamint (2) a szelekciós ágenst tartalmazó és nem tartalmazó lemezeken számolt telepek számára (illetve mikrotiter módszer használata esetén a telepet nem tartalmazó lyukak számára). A mutációs gyakoriság kiszámításának alapja a mutáns telepek száma (a szelekciós ágenst tartalmazó lemezeken) kiigazítva a (szelekciós ágenst nem tartalmazó lemezeken mért) kolóniaképző képességgel. A mutációs gyakoriságot az 1 millió életképes sejtre jutó mutáns sejtek számaként kell kifejezni (a fogalommeghatározásokat lásd az 1. függelékben).

37. Fel kell jegyezni az egyes tenyészetekhez tartozó adatokat. Ezenkívül az összes adatot össze kell foglalni táblázatos formában.

Elfogadhatósági kritériumok

38. Egy-egy vizsgálat elfogadhatósága az alábbi kritériumokon alapul:

— A párhuzamos negatív kontroll a 33. pont szerint foglalható bele a laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisába.

— A párhuzamos pozitív kontrolloknak (lásd a 24. pontot) a pozitív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisban generált válaszreakciókkal összeegyeztethető válaszokat, valamint a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva statisztikailag szignifikáns növekedést kell előidézniük.

— Két kísérleti körülmény (metabolikus aktiválással és metabolikus aktiválás nélkül történő) vizsgálatára került sor, kivéve, ha az egyik pozitív eredményeket hozott (lásd a 25. pontot).

— Megfelelő számú sejt és koncentráció elemezhető (25., 26. és 19. pont).

— A legmagasabb koncentráció kiválasztására vonatkozó kritériumok összhangban vannak a 20., 21. és 22. pontban ismertetett kritériumokkal.

Az eredmények értékelése és értelmezése

39. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha a vizsgált kísérleti körülmények bármelyikében:

▼M8

— legalább az egyik vizsgálati koncentráció statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,

— a megfelelő trendpróbával történő értékelés arra utal, hogy a növekedés a koncentrációval összefügg,

— ezen eredmények bármelyike a negatív történeti kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) kívül esik; lásd a 33. pontot).

Ezen kritériumok mindegyikének teljesülése esetén úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag ebben a vizsgálati rendszerben képes génmutációkat előidézni a tenyésztett emlőssejtekben. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (46) (48).

40. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha valamennyi vizsgált kísérleti körülmény esetén fennáll, hogy:

— a vizsgálati koncentrációk egyike sem mutat statisztikailag szignifikáns növekedést a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva, a megfelelő trendpróbával végzett értékelés nem mutat koncentrációval összefüggő növekedést,

— valamennyi eredmény a negatív történeti kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) belül van; lásd a 33. pontot).

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag ebben a vizsgálati rendszerben nem képes génmutációkat előidézni a tenyésztett emlőssejtekben.

41. Az egyértelműen pozitív vagy negatív válasz igazolása nem követelmény.

42. Olyan esetekben, amikor a válaszreakció – a fentiekben leírtak szerint – nem egyértelműen negatív vagy pozitív, illetve egy adott eredmény biológiai relevanciája megállapításának alátámasztása érdekében az adatokat szakértői vélemény és/vagy további vizsgálatok alapján kell értékelni. Hasznos lehet egy megismételt kísérlet lehetőleg módosított kísérleti körülmények (például a koncentrációk felosztása, más [S9-es koncentráció vagy S9 eredetű] metabolikus aktiválási feltételek) melletti elvégzése.

43. Ritka esetekben az adatkészlet még további vizsgálatok után is eleve kizárja a pozitív vagy negatív eredményekre vonatkozó következtetést. Ezért a vizsgálati vegyi anyag válaszreakcióját kétértelműnek kell minősíteni (amit úgy kell értelmezni, hogy egyenlő valószínűséggel tekinthető pozitívnak és negatívnak).

Vizsgálati jelentés

44. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

— eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;

— adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

▼**M8**

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi

— előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

Oldószer:

— az oldószer kiválasztásának indokolása;

— az oldószernek a végleges tápfolyadékon belüli aránya.

Sejtek:

Laboratóriumi törzstenyészetek esetén:

— a sejtvonalak típusa és eredete;

— a passzálások száma, ha rendelkezésre áll, és története a laboratóriumban;

— a kariotípus jellemzői és/vagy a modális kromoszómaszám;

— a sejttenyészetek fenntartásának módszerei.

— a mikoplazmamentesség;

— sejt megduplázódási ideje.

Vizsgálati körülmények:

— a koncentrációk kiválasztásának és a tenyészetek számának indokolása, beleértve például a citotoxicitási adatokat és az oldhatóságra vonatkozó korlátokat;

— a közeg összetétele, CO_2-koncentráció, páratartalom;

— a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja a tápfolyadékon belüli végső koncentrációjaként kifejezve (például µg vagy mg/a tápfolyadék ml-e vagy mM-ja);

— a tápfolyadékhoz adott oldószer és vizsgálati vegyi anyag koncentrációja (és/vagy térfogata);

— inkubációs hőmérséklet;

— inkubációs idő;

— a kezelés időtartama;

— sejtsűrűség a kezelés időtartama alatt;

— a metabolikus aktivációs rendszer típusa és összetétele (az S9 eredete, az S9 keverék elkészítési módszerei, az S9 keverék és az S9 koncentrációja vagy térfogata a végleges tápfolyadékban, az S9 minőségellenőrzése);

— pozitív és negatív kontrollként szolgáló anyagok, végső koncentrációk az egyes kezelési körülmények esetén;

▼**M8**

— az expressziós időszak hossza (beleértve a leültetett sejtek számát, a szubkultúrákat és a tápfolyadékok cseréjét, ha szükséges);

— a szelekciós ágens neve és koncentrációja;

— a vizsgálatok elfogadhatósági kritériumai;

— az életképes és mutáns sejtek számának megállapítására használt módszerek;

— a citotoxicitás mérésére alkalmazott módszerek;

— a citotoxicitás és az alkalmazott módszer szempontjából lényeges kiegészítő információk;

— a leültetést követően végzett inkubálás időtartama;

— azok a kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e;

— a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás meghatározására alkalmazott módszerek.

Eredmények:

— az egyes tenyészetek esetében kezelt sejtek és átültetett sejtek száma;

— a citotoxicitás mérése és egyéb megfigyelések, ha vannak ilyenek;

— a kicsapódás jelei és a meghatározás időpontja;

— a szelektív és nem szelektív folyadékba leültetett sejtek száma;

— a telepek száma a nem szelektív közegben és a rezisztens telepek száma a szelektív közegben, valamint az ezeknél tapasztalható mutációs gyakoriság;

— amennyiben lehetséges, a koncentráció-válasz összefüggés;

— a párhuzamos negatív (oldószeres) és a pozitív kontrollokra vonatkozó adatok (koncentrációk és oldószerek);

— a történeti negatív (oldószeres) és a pozitív kontrollokra vonatkozó adatok, a tartományok, az átlagok, a szórás és a konfidencia-intervallum (pl. 95 %) megadásával, továbbá az adatok száma;

— statisztikai elemzések (az egyes tenyészetek és adott esetben az összevont párhuzamos tenyészetek tekintetében), valamint p-értékek, ha meghatározásra kerültek.

Az eredmények értékelése.

Következtetések

SZAKIRODALOM

(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, Párizs.

(2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

▼**M8**

(3) Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394-403.

(5) Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121-128.

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235-239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. Mutation Res., 196, 17-36.

(8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

(9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.

(10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

(11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177-183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 5841-256.

(14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

(16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

▼**M8**

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 66-101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193-214.

(19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165-175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

(21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): 9616-9620.

(22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Előkészület alatt álló kézirat).

(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. (szerk.), Elsevier, North-Holland, 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). A környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokról szóló stockholmi egyezmény, az ENSZ Környezetvédelmi Programja (UNEP). Elérhető a következő címen: [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, 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). Hozzáférés a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezettől kérhető.

(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). Ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok: UVCB-k,

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Elérhető a következő címen:[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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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., (szerk.) Cambridge University Press, Cambridge, 141-154.

(48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼M8

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Bázispár-szubsztitúciót okozó mutagének: azok a vegyi anyagok, amelyek a bázispárok szubsztitúcióját okozzák a DNS-ben.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Kolóniaképző képesség: azon alacsony sűrűséggel leültetett sejtek százalékaránya, amelyek képesek megszámolható teleppé fejlődni.

Koncentrációk: a vizsgálati vegyi anyagnak a tápfolyadékon belüli végső koncentrációira utalnak.

Citotoxicitás: az e vizsgálati módszerbe tartozó vizsgálatok esetében a citotoxicitás a kezelt sejtek relatív túlélésének csökkenése a negatív kontrollhoz viszonyítva (lásd az adott pontot).

Forward (előremutató) mutáció: a mutáns alak szülőktől származó típusától eltérő olyan génmutáció, amely a kódolt protein enzimaktivitásának vagy funkciójának változását vagy elvesztését eredményezi.

Frameshiftet okozó mutagének: azok a vegyi anyagok, amelyek egy vagy több bázispár addícióját vagy delécióját okozzák a DNS-ben.

Genotoxikus: általános kifejezés, amely magába foglalja a DNS- vagy kromoszómakárosodás valamennyi típusát, köztük a DNS-töréseket, adduktok képződését, átrendeződéseket, mutációkat, kromoszómaaberrációkat és aneuploidiát. A genotoxikus hatások nem minden típusa eredményez mutációkat vagy stabil kromoszómakárosodást.

HAT-tápfolyadék: hipoxantint, aminopterint és timidint tartalmazó tápfolyadék, amelyet Hprt-mutánsok szelektálására alkalmaznak.

Mitotikus rekombináció: a mitózis során a homológ kromatidok rekombinációja, ami kettős szálú DNS-töréseket vagy a heterozigótaság elvesztését okozhatja.

MPA-tápfolyadék:: xantint, adenint, timidint, aminopterint és mikofenolsavat tartalmazó tápfolyadék, amelyet Xprt-mutánsok szelektálására használnak.

Mutagén: örökletes elváltozást idéz elő a génekben lévő DNS-bázispár-szekvencia(k)ban vagy a kromoszómák szerkezetében (kromoszómaaberrációk).

Mutációs gyakoriság: a megfigyelt mutáns telepek számának és a szelektív tápfolyadékba leültetett sejtek számának aránya, kiigazítva a szelekció idején mért kolóniaképző képességgel (vagy életképességgel).

Fenotípusos expresszió ideje: a kezelést követő időtartam, amely során a genetikai változás rögzül a genomban, és a korábban meglévő géntermékek olyan mértékben kiürülnek, hogy a fenotípus-tulajdonság megváltozik.

Relatív túlélés: A relatív túlélést a kezelés okozta citotoxicitás mértékeként használják. A relatív túlélés a közvetlenül a kezelést követően átültetett sejtek kolóniaképző képessége, kiigazítva a kezelés során bekövetkezett sejtpusztulással, majd összevetve a negatív kontrollok (túlélési arányuk 100 %-nak tekintendő) kolóniaképző képességével.

S9 májfrakciók: 9 000 g centrifugálás utáni májhomogenátum felülúszója, azaz a nyers májextraktum.

▼**M8**

S9 keverék: az S9 májfrakció és a metabolikus enzimaktivitáshoz szükséges kofaktorok keveréke.

Oldószeres kontroll: a csak a vizsgálati vegyi anyag feloldására használatos oldószert tartalmazó kontrolltenyészetek meghatározására szolgáló általános kifejezés.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Nem kezelt kontroll: nem kezelt (azaz sem a vizsgálati vegyi anyaggal, sem oldószerrel nem kezelt), de a vizsgálati vegyi anyagot befogadó tenyészetekkel párhuzamosan és azonos módon feldolgozott tenyészetek.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

▼M8

2. függelék

A CITOTOXICITÁS ÉS A MUTÁCIÓS GYAKORISÁG MEGHATÁROZÁSÁRA SZOLGÁLÓ KÉPLETEK

A citotoxicitást a relatív túlélés alapján kell értékelni, ami a közvetlenül a kezelést követően átültetett sejtek kolóniaképző képessége (CE), kiigazítva a kezelés során bekövetkezett sejtpusztulással, majd összevetve a negatív kontrollok (túlélési arányuk 100 %-nak tekintendő) kiigazított kolóniaképző képességével (lásd alább a relatív túlélés kiszámítására szolgáló képletet).

A vizsgálati vegyi anyaggal kezelt tenyészetek kiigazított kolóniaképző készségét az alábbi módon kell meghatározni:

$$\text{Kiigazított kolóniaképző készség} = \frac{\text{A sejtek száma a kezelés végéu}}{\text{A sejtek száma a kezelés kezdetén}}$$

A vizsgálati vegyi anyaggal kezelt tenyészetek relatív túlélését az alábbi módon kell meghatározni:

$$\text{Relatív túlélés} = \frac{\text{Kiigazított kolóniaképző készség kezelt tenyészetben}}{\text{Kiigazított kolóniaképző készség oldószeres kontroliban}} \times 100$$

A mutációs gyakoriság a szelektív tápfolyadékban lévő mutáns telepek kolóniaképző képességének és a nem szelektív tápfolyadék kolóniaképző képességének aránya, amelyet ugyanazon tenyészetre vonatkozva kell meghatározni, a szelekció időpontjában.

$$\text{Mutációs gyakoriság} = \frac{\text{Mutáns telepek kolóniaképző készsége szelektív médiumban}}{\text{Kolóniaképző készség nem szelektív közegben}}$$

Amikor lemezeket alkalmaznak a kolóniaképző képesség meghatározásához:

Kolóniaképző képesség = Telepek száma/leültetett sejtek száma.

Amikor mikrotiter lemezeket alkalmaznak a kolóniaképző képesség meghatározásához:

A mikrotiter lemezek egyes lyukaiban lévő telepek száma Poisson-eloszláson alapul.

Kolóniaképző képesség = -LnP(0)/az egyes lyukakba leültetett sejtek száma

Ahol a -LnP(0) az üres lyukak valószínűsíthető száma a leoltott lyukak számához képest, és az alábbi képlettel határozható meg:

LnP(0) = -Ln (üres lyukak száma/leültetett lyukak száma)

▼M7

———————

———————

———————

▼B

B.21. *IN VITRO* EMLŐSSEJT-TRANSZFORMÁCIÓS VIZSGÁLATOK

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az emlőssejtkultúra-rendszerek felhasználhatók a rosszindulatú *in vivo* átalakulással összefüggésbe hozott kémiai vegyületek által kiváltott *in vitro* fenotípusos változások kimutatására. A széles körben alkalmazott sejtvonalak közé tartozik a C3H10$T_{1/2}$, a 3T3, az SHE, a Fischer jelzésű patkánysejtvonal; a vizsgálatok a sejtek morfológiai változásain, fókuszképződésén vagy félszilárd agaron való megtelepedésiképesség-változásain alapulnak. Kevésbé széles körben használt rendszerek is léteznek, amelyek más fiziológiai vagy morfológiai változásokat mutatnak ki a sejtekben, a rákkeltő anyagokkal történő kezelést követően. Az *in vitro* vizsgálatok egyetlen végpontja esetében sem bizonyított az a mechanizmus, amely a hatás és a karcinogén folyamat összefüggését magyarázza. Egyes vizsgálati rendszerek alkalmasak tumorpromoterek kimutatására. A citotoxicitást a vizsgált anyagnak a kolóniaképző képességre (klónozási hatékonyság) vagy a kultúrák növekedési sebességére gyakorolt hatásával határozhatják meg. A citotoxicitás mérése azt a célt szolgálja, hogy megállapítsák, a vizsgált anyag adagja toxikológiailag releváns volt-e, de nem használható minden mérésnél a transzformációs gyakoriság kiszámítására, hiszen egyes vizsgálatok esetében hosszabb inkubációra és/vagy ismételt szélesztésre van szükség.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Sejtek

Az alkalmazott transzformációs vizsgálattól függően számos sejtvonal vagy primer sejttenyészet jöhet szóba. A vizsgálatot végző személynek biztosítania kell, hogy az elvégzendő vizsgálat során a megfelelő fenotípusos változás következik be az ismert rákkeltő hatású anyaggal való expozíciót követően, és hogy a vizsgálatot végző személy által vezetett kutatólaboratóriumban végzett vizsgálat megbízhatósága és érvényessége bizonyított és dokumentálható.

Tápfolyadék

Olyan tápfolyadékot és vizsgálati körülményeket kell alkalmazni, amelyek a legjobban illenek a használt transzformációs vizsgálathoz.

▼B

Vizsgált anyag

A vizsgált anyagokat a sejtek kezelését megelőzően tápfolyadékban vagy megfelelő vivőanyagban kell előkészíteni vagy feloldani, illetve szuszpendálni. A vivőanyag végső koncentrációja a kultúrában nem befolyásolhatja a sejtek életképességét, növekedési sebességét vagy a transzformáció előfordulási gyakoriságát.

Anyagcsere-aktiválás

A sejteket a vizsgált vegyület hatásának megfelelő anyagcsere-aktiváló rendszer jelenlétében és hiányában egyaránt ki kell tenni. A másik lehetőség, hogy belső metabolikus aktivitással rendelkező sejttípusokat használunk, ám ilyenkor az aktivitás jellegét és mértékét ismerni kell, hogy az megfeleljen a vizsgált kémiai osztálynak.

Vizsgálati körülmények

Pozitív és negatív kontrollok használata

Minden vizsgálatnak pozitív kontrollként tartalmaznia kell egy közvetlenül ható vegyületet és egy metabolikus aktiválást igénylő vegyületet is; ezenkívül negatív (vivőanyag-) kontrollt is kell használni.

Néhány példa a pozitív kontrollként felhasználható anyagokra:

— közvetlenül ható vegyületek:

  — etil-metán-szulfonát,

  — béta-propiol akton,

— közvetve ható vegyületek:

  — 2-acetoamin-fluorén,

  — 4-dimetil-amino-azo-benzén,

  — 7,12-dimetil-benzantracén.

Ahol szükséges, alkalmazni lehet még egy pozitív kontrollt is, amely a vizsgált anyaggal egyező vegyületosztályba tartozik.

Expozíciós koncentráció

A vizsgált anyag több koncentrációját kell alkalmazni. E mennyiségeknek koncentrációfüggő mérgező hatást kell eredményezniük, amelyek jellemzője, hogy a legnagyobb vizsgált koncentrációval alacsony túlélési arány jár, míg a legalacsonyabb koncentrációval kezelt csoportban a túlélés megközelítőleg megegyezik a negatív kontrollcsoportéval. Vízben viszonylag rosszul oldódó anyagokat a megfelelő eljárások alkalmazásával oldhatóságuk határáig szükséges vizsgálni. A vízben jól oldódó és nem mérgező anyagok felső koncentrációját esetenként kell meghatározni.

▼B

A kísérlet végrehajtása

A sejteket a felhasznált vizsgálati rendszer függvényében megfelelő ideig kezelik az anyaggal, ami adott esetben a tápfolyadék cseréjét követő ismételt adagolást jelenthet (és szükség esetén friss anyagcsere-aktiváló keveréket), hosszabb expozíció esetében. A szükséges belső metabolikus aktivitással nem rendelkező sejteket a megfelelő metabolikus akti válórendszer jelenlétében, illetve hiányában is kezelni kell a vizsgált anyaggal. A kezelés végén a sejtek környezetéből kimossák az anyagot, és olyan, megfelelő körülmények között tenyésztik, amelyek mellett a vizsgált, transzformált fenotípus megjelenhet, és a transzformáció előfordulási gyakorisága meghatározható. Valamennyi eredményt független vizsgálattal kell megerősíteni.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely számos fajtát jelenthet attól függően, hogy milyen meghatározást végzünk, pl. telepszám, pozitív telepek, illetve a transzformált sejtek száma. Ahol szükséges, a túlélési arányt a kontrollértékek százalékában, a transzformációs gyakoriságot pedig a túlélő sejtekre eső transzformált sejtek számának arányában kell megadni. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— a felhasznált sejttípus, a sejtkultúrák száma, a sejtkultúrák fenntartásának módszere,

— a vizsgálat körülményei: a vizsgált anyag koncentrációja, a felhasznált vivőanyag, az inkubációs idő, a kezelés gyakorisága és időtartama, a sejtsűrűség a kezelés alatt, a felhasznált külső anyagcsere-aktiváló rendszer, a pozitív és negatív kontrollok, a megfigyelt fenotípus leírása, a használt szelektív rendszer (ha alkalmazható), a dózisok megválasztásának indokolása,

— az életképes és transzformált sejtek megszámlálásához használt módszer,

— az eredmények statisztikai feldolgozása,

— az eredmények megvitatása,

— az eredmények értelmezése.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

▼M8

B.22. DOMINÁNS LETÁLIS VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKON

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 478. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. A vizsgálati módszereket a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és az állatok kíméletére irányuló megfontolások figyelembevételével rendszeresen felülvizsgálják. A vizsgálati módszer jelenlegi felülvizsgált változata tükrözi a vizsgálat csaknem harminc éves alkalmazása során szerzett tapasztalatokat, valamint azon alapul, hogy ez a vizsgálat beépíthető más toxicitási vizsgálatokba, például fejlődési, reprodukciós vagy genotoxicitási vizsgálatokba, vagy azokkal együtt alkalmazható; mindazonáltal a vizsgálat – korlátaiból és a kísérleti állatok nagy számából fakadóan – nem alkalmas elsődleges módszerként való használatra, ehelyett kiegészítő vizsgálati módszerként alkalmazható kizárólag olyan esetekben, amikor más módszerrel nem lehet eleget tenni a szabályozási követelményeknek. A toxicitási vizsgálatok kombinálása révén jelentősen csökkenthető a toxicitási vizsgálatokban alkalmazandó állatok száma. Az OECD kidolgozott egy, a genetikai toxikológiai vizsgálatokról tömör tájékoztatást nyújtó, az OECD genetikai toxikológiára vonatkozó vizsgálati iránymutatásainak közelmúltbeli változásait áttekintő dokumentumot (1).

2. A domináns letális vizsgálat célja annak kimutatása, hogy egy adott vegyi anyag okoz-e a csírasejtekben kromoszóma-rendellenességre visszavezethető mutációkat. Emellett a domináns letális vizsgálat a genotoxicitás értékelése szempontjából is releváns, mert az *in vivo* metabolizmus, valamint a farmakokinetikai és a DNS-hibajavító eljárások tényezői – jóllehet fajonként eltérnek – aktívak és hozzájárulnak a reakcióhoz. A vizsgálati vegyi anyag beadását követően kimutatott domináns letális mutáció azt jelzi, hogy az adott vizsgálati vegyi anyag hatást gyakorolt a vizsgált állat csíraszöveteire.

3. A domináns letális mutációk embrionális, illetve magzati elhalást okoznak. A vizsgálati vegyi anyag beadását követően kimutatott domináns letális mutáció azt jelzi, hogy az adott vizsgálati vegyi anyag a vizsgált állat esetében hatást gyakorolt a csírasejtekre.

4. A domináns letális vizsgálat hasznos a szomatikus *in vivo* végpontok használatával végzett vizsgálatok pozitív eredményének megerősítésére, továbbá releváns végpontja a csírasejtvonalon keresztül átörökített genetikai betegségekben rejlő, embereket érintő veszélyek és kockázatok előrejelzésének. A vizsgálat ugyanakkor munkaigényes, és jelentős mennyiségű állat szükséges hozzá; következésképpen elvégzése rendkívül költséges és időigényes. Mivel a domináns letális mutációk spontán gyakorisága meglehetősen nagy, a vizsgálat általában korlátozott érzékenységgel bír a mutációs gyakoriság enyhe növekedésének észlelése terén.

5. A kulcsfontosságú fogalmak meghatározásai az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

6. A vizsgálatot leginkább egereken végzik (2) (3) (4), de egyes esetekben – amennyiben tudományosan indokolt – más fajok, például patkányok (5) (6) (7) (8) is megfelelőek lehetnek. A domináns letális hatások általában nagymérvű kromoszómakárosodásra (szerkezeti és számbeli rendellenességekre) vezethetők vissza (9) (10) (11), de a génmutáció sem zárható ki az okok

▼M8

közül. A domináns letális mutáció magában a csírasejtben, illetve a megtermékenyítést követően a korai embrióban alakul ki, az ivarsejt hibás működését nem idézi elő, ugyanakkor a megtermékenyített pete vagy a fejlődő embrió elhalását okozza.

7. Minden egyes hímet megfelelő időközönként egymás után szűz nőstényekkel pároztatnak. A kezelést követő pároztatások száma a domináns letális vizsgálat végső céljától függ (23. pont), és azt úgy kell meghatározni, hogy a hím csírasejt érésének összes fázisát értékelni lehessen a domináns letális hatás szempontjából (12).

8. Ha létezik arra vonatkozó bizonyíték, hogy a vizsgálati vegyi anyag vagy annak metabolitja(i) nem éri(k) el a herét, e vizsgálat alkalmazása nem megfelelő.

A VIZSGÁLAT ELVE

9. Általában hím állatokat kezelnek megfelelő expozíciós úton a vizsgálati vegyi anyaggal, és a kezelt állatokat kezeletlen szűz nőstényekkel pároztatják. Egymás után következő pároztatási időszakok alkalmazásával különféle csírasejttípusok vizsgálhatók. A pároztatást követően megfelelő idő elteltével a nőstényeken eutanáziát hajtanak végre, majd méhüket megvizsgálva megállapítják a beágyazódások, valamint az élő és elhalt embriók számát. Egy adott vizsgálati vegyi anyag domináns letalitásának meghatározásához egybevetik a kezelt csoportban egy nőstényre jutó élő, beágyazódott embriók számát a vivőanyagos/oldószeres kontrollcsoportban egy nőstényre jutó élő, beágyazódott embriók számával. Az egy nőstényre jutó élettelen, beágyazódott embriók számának növekedése a kezelt csoportban a kontrollcsoportban tapasztalható hasonló adathoz képest a vizsgálati vegyi anyag által kiváltott, beágyazódás utáni veszteséget tükrözi. A beágyazódás utáni veszteség kiszámításához meghatározzák az elhalt és az összes beágyazódott embrió arányát a kezelt csoportban, majd összevetik azt a kontrollcsoport hasonló adatával. A beágyazódás előtti veszteség úgy becsülhető meg, hogy összehasonlítják a sárgatestek számából kivont összes beágyazódott embrió számát vagy az egy nőstényre jutó összes beágyazódott embrió számát a kezelt és kontrollcsoportokban.

A LABORATÓRIUM JÁRTASSÁGÁNAK IGAZOLÁSA

10. A vizsgálatban való jártasság igazolása érdekében a laboratóriumoknak bizonyítottan képesnek kell lenniük a közzétett adatok (például (13) (14) (15) (16) (17) (18)) szerinti domináns letalitási gyakoriság reprodukálására pozitív kontrollként szolgáló – például az 1. táblázatban felsorolt – anyagokkal (ideértve a gyenge reakciókat is) és vivőanyagos kontrollokkal, valamint a negatív kontrollokból származó adatoknak olyan gyakoriságot kell mutatniuk, amely összhangban áll az elfogadható adattartománnyal (lásd a fenti referenciákat) vagy a laboratóriumi történeti kontrollok eloszlásával, ha rendelkezésre állnak történeti adatok.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Az állatfaj kiválasztása

11. Egészséges, ivarérett, általánosan használt laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni. Általában egereket használnak, bár a patkányok is megfelelőek lehetnek. Bármely egyéb megfelelő emlősfaj használható, ha a jelentésben szerepel tudományos indokolás.

▼M8

Az állatok tartásának és etetésének körülményei

12. Rágcsálók esetében a kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének 22° C-nak (±3 ° C) kell lennie. Bár ideális esetben a helyiség relatív páratartalmának 50–60 %-nak kell lennie, legyen legalább 40 %, és a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgálati vegyi anyaggal való megfelelő keveredés szükségessége is befolyásolhatja, ha a vizsgálati vegyi anyag beadása ilyen módon történik. Ha agresszív viselkedés nem várható és nem tapasztalható, a rágcsálókat kezelés és pároztatás előtt azonos nemű kis (legfeljebb öt) egyedből álló csoportokban, lehetőleg szilárd, megfelelő környezetgazdagítással ellátott ketrecekben kell tartani. Ha tudományos szempontból indokolt, az állatok egyedileg is elhelyezhetők.

Az állatok előkészítése

13. Egészséges és ivarérett felnőtt hím és nőstény állatokat osztanak véletlenszerűen a kontroll- és kezelt csoportokba. Az egyes állatokat humánus, minimálisan invazív módszerrel (például gyűrűzéssel, címkézéssel, mikrocsip beültetésével vagy biometrikus azonosítással, de a lábujj vagy a fül kilyukasztása nélkül) egyedi azonosítóval kell ellátni, és legalább öt napig szoktatni kell a laboratóriumi körülményekhez. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek a ketrec elhelyezéséből adódó esetleges hatások. A pozitív kontrollal és a vizsgálati vegyi anyaggal való keresztszennyeződés kerülendő. A vizsgálat kezdetén az állatok tömege közötti eltérésnek minimálisnak kell lennie és nem haladhatja meg az ivaronkénti átlag ± 20 %-át.

A dózisok előkészítése

14. Az állatoknak történő adagolás előtt a szilárd halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni kell megfelelő oldószerben vagy vivőanyagban, vagy bele kell keverni a takarmányba vagy az ivóvízbe. A folyékony vizsgálati vegyi anyagok közvetlenül adagolhatók vagy az adagolás előtt hígíthatók. Belélegzéses expozíció esetén a vizsgálati vegyi anyagok fizikai-kémiai tulajdonságaiktól függően gáz, gőz vagy szilárd/folyadék aeroszol formában adagolhatók. A vizsgálati vegyi anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve akkor, ha a stabilitási adatok bizonyítják a tárolás elfogadhatóságát és meghatározzák a megfelelő tárolási feltételeket.

Vizsgálati körülmények

Oldószer/Vivőanyag

15. Az oldószer/vivőanyag nem okozhat toxikus hatásokat a választott dózisok mellett, és nem alkalmazható olyan anyag, amelyről feltehető, hogy kémiai reakcióba fog lépni a vizsgálati vegyi anyaggal. Jól ismert oldószerektől eltérő oldószerek/vivőanyagok alkalmazása esetén azok használatát alá kell támasztani a kompatibilitásukat jelző referenciaadatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát ajánlatos megfontolni. Általánosan használt, kompatibilis oldószer/vivőanyag például többek között a víz, a fiziológiás sóoldat, a metil-cellulóz-oldat, a karboximetil-cellulóz-nátriumsó-oldat, az olívaolaj és a kukoricaolaj.

Pozitív kontrollok

16. Egyidejűleg alkalmazott pozitív kontrollállatokat mindig kell alkalmazni, kivéve ha a laboratórium igazolta a vizsgálat lebonyolításában szerzett jártasságát, és a közelmúltban (például az elmúlt 5 évben) rutinszerűen használta a vizsgálatot. Ugyanakkor a pozitív kontrollcsoportba tartozó állatok esetében nem szükséges a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt állatokéval megegyező adagolási módot alkalmazni, vagy mintát venni valamennyi pároztatási időszakokban. Pozitív kontrollként olyan anyagokat kell használni,

▼M8

amelyekről ismert, hogy a vizsgálati feltételek mellett domináns letális hatást fejtenek ki. A kezelés kivételével a kontrollcsoportokba osztott állatokat azonos bánásmódban kell részesíteni a kezelt csoportokban lévő állatokkal.

17. A pozitív kontrollanyagok dózisát úgy kell megválasztani, hogy enyhe vagy mérsékelt hatást fejtsenek ki, lehetővé téve a vizsgálat teljesítőképességének és érzékenységének kritikus értékelését, ugyanakkor megbízhatóan pozitív domináns letális hatást eredményezzenek. A pozitív kontrollként szolgáló anyagokra és a megfelelő dózisokra az 1. táblázat tartalmaz példákat.

1. táblázat

Példák pozitív kontrollként szolgáló anyagokra

Anyag [CAS-szám] (hivatkozási szám)	Effektív dózis tartománya (mg/kg) (rágcsáló fajok)	Adagolás időtartama (napokban)
Trietilén-melamin [51-18-3] (15)	0,25 (egerek)	1
Ciklofoszfamid [50-18-0] (19)	50–150 (egerek)	5
Ciklofoszfamid [50-18-0] (5)	25–100 (patkányok)	1
Etil-metánszulfonát[62-50-0] (13)	100-300 (egerek)	5
Akrilamid monomer [79-06-1] (17)	50 (egerek)	5
Klórambucil [305-03-3] (14)	25 (egerek)	1

Negatív kontrollok

18. Minden mintavételi időpontban negatív kontrollállatokat is kell használni, amelyeket csak oldószerrel vagy vivőanyaggal kezeltek, és a kezelésük egyébiránt ugyanolyan módon történik, mint a kezelt csoportoké (20). Ha nem állnak rendelkezésre olyan történeti vagy publikált kontrolladatok, amelyek igazolják, hogy a választott oldószer/vivőanyag nem idéz elő domináns letális vagy egyéb káros hatásokat, a vivőanyagos kontroll elfogadhatóságának megállapítása érdekében nem kezelt kontrollállatokat is alkalmazni kell minden mintavételi időpontban.

ELJÁRÁS

Az állatok száma

19. Minden egyes hímet előre meghatározott megfelelő időközönként (például hetente egyszer, 21. és 23. pont) egymás után, lehetőleg egyetlen szűz nősténnyel pároztatnak. A hímek csoportonkénti számát előre meg kell határozni, méghozzá úgy, hogy (az egyes pároztatási időszakokban pároztatott nőstényekkel együtt) kellő létszámban legyenek ahhoz, hogy megfelelő statisztikai erőt képviseljenek a domináns letalitási gyakoriság legalább megduplázódásához (44. pont).

20. Az egyes pároztatási időszakokban rendelkezésre álló nőstények számát szintén az általuk képviselt statisztikai erő alapján kell előre meghatározni úgy, hogy lehetővé tudják tenni a domináns letalitási gyakoriság legalább megduplázódásának észlelését (vagyis elegendő vemhes nőstény legyen legalább összesen 400 beágyazott embrió biztosításához) (20) (21) (22) (23), illetve hogy elemzési egységenként (vagyis adagolásonkénti pároztatott csoportként) legalább egy elhalt, beágyazódott embrióra lehessen számítani (24).

▼M8

Beadási időszak és pároztatási időszakok

21. A kezelés utáni pároztatási időszakok számát a kezelési ütemterv határozza meg, amelynek biztosítania kell, hogy a hím csírasejt érésének minden fázisát értékelni lehessen a domináns letális hatás előidézése szempontjából (12) (25). A legfeljebb napi öt dózis beadásával járó egyszeri kezelés esetén az utolsó kezelés időpontjától számítva 8 (egereknél) vagy 10 (patkányoknál) pároztatást kell végrehajtani az egyhetes időszakok alatt. Többszöri dózis beadásakor a pároztatási időszakok száma a beadási időszak növelésével arányosan csökkenthető, amennyiben értékelni lehet a spermaképződés valamennyi fázisát (például egy 28 napos expozíciós időszak után csupán 4 hetes pároztatás elegendő az egerek összes spermaképződési fázisának elemzéséhez). Minden kezelési és pároztatási ütemtervet tudományosan indokolni kell.

22. A nőstényeknek legalább egy ivari ciklus erejéig a hímekkel kell maradniuk (egy hét például mind az egereknél, mind a patkányoknál lefed egy ivari ciklust). Az egyhetes időköz alatt nem párosított nőstények felhasználhatók a következő pároztatási időszakban. Alternatív megoldásként a nőstények mindaddig a hímekkel tarthatók, amíg a párzásra sor nem került, ami a hüvelyben a sperma jelenlétéből, illetve a hüvelyi dugó megjelenéséből határozható meg.

23. Az expozíciós és pároztatási eljárás függ a domináns letalitási vizsgálat végső céljától. Amennyiben a cél annak meghatározása, hogy egy adott vegyi anyag önmagában okoz-e domináns letális mutációt, az elfogadott módszer alapján az expozíciónak ki kell terjednie a teljes spermaképződési ciklusra (ami egerek esetén heti 5–7 kezeléssel 7 hét), és egyszer kell pároztatni, a ciklus végén. Ha azonban a cél a domináns letalitás előidézésére érzékeny csírasejttípus meghatározása, ajánlatos inkább egyszeri vagy 5 napon át tartó expozíciót követően egyhetes időközökben pároztatni.

Dózisok

24. Ha előzetes range-finding studyvizsgálatra kerül sor amiatt, mert már nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok a dózisok megválasztásának segítéséhez, azt ugyanazon laboratóriumban, ugyanazon fajok, törzsek, nemek és kezelési eljárások alkalmazásával kell végrehajtani, mint amelyeket a fő vizsgálatban fognak használni (26). A vizsgálatnak a maximális tolerálható dózis (MTD) meghatározására kell irányulnia, amely anélkül, hogy vizsgálatkorlátozó toxicitást mutatna, a vizsgálati időszak tartamához viszonyítva a legmagasabb tolerált dózis (például rendellenes viselkedést vagy reakciókat, enyhe testtömeg-csökkenést vagy vérképzőrendszert érintő citotoxicitást vált ki), de elhullást, illetve humánus eutanáziát igénylő, bizonyított fájdalmat, szenvedést vagy stresszt nem idéz elő (27).

25. Az MTD nem befolyásolhatja kedvezőtlenül a pároztatás sikerét sem (21).

26. A kis, nem mérgező dózisban specifikus biológiai aktivitást mutató vizsgálati vegyi anyagok (mint például a hormonok és a mitogének), valamint azok a vegyi anyagok, amelyek a toxikokinetikai tulajdonságok telítődését mutatják, kivételek lehetnek a dózismeghatározási követelmények alól, és eseti alapon kell őket értékelni.

27. Annak érdekében, hogy dózis–válasz adatokat lehessen szerezni, a teljes vizsgálatnak egy negatív kontrollcsoportot, valamint legalább három dózist kell tartalmaznia, ahol a dózisok közötti szorzótényező általában 2, de legfeljebb 4. Ha a vizsgálati vegyi anyag nem okoz toxicitást a dózistartománykereső vizsgálatban vagy meglévő adatok alapján, egyszeri adagolás esetén a legmagasabb dózisnak 2 000 mg/testtömegkilogrammnak kell lennie. Ha azonban a vizsgálati vegyi anyag toxicitást okoz, az MTD-nek a beadott legmagasabb dózisnak kell lennie, és a használt dózisoknak lehetőleg le

▼M8

kell fedniük a maximálistól az alacsony mértékű toxicitást okozó vagy toxicitást egyáltalán nem okozó dózisig terjedő tartományt. Ha a vizsgálati vegyi anyag nem okoz toxicitást, legalább 14 napig tartó beadási időszak esetén, a legmagasabb dózisnak 1 000 mg/testtömeg kg/napnak, 14 napnál rövidebb beadási időszak esetében pedig 2 000 mg/testtömeg kg/napnak kell lennie.

A dózisok beadása

28. Az emberi expozíció várható útját figyelembe kell venni a vizsgálat tervezése során. Ezért az egyéb expozíciós utak – például takarmány, ivóvíz, szubkután, intravénás, topikális, inhalációs, orális (gyomorszondával) vagy implantáció – is kiválaszthatók indokoltként. Az utat mindenesetre úgy kell kiválasztani, hogy biztosítsa a célszövet(ek) megfelelő expozícióját. A hasüregbe adott injekció általában nem ajánlott, mivel az nem tervezett emberi expozíciós út, és kizárólag tudományos indokolással alkalmazható. Ha a vizsgálati vegyi anyagot a takarmányba vagy ivóvízbe keverik, különösen egyszeri adagolás esetén ügyelni kell arra, hogy a táplálék és a víz fogyasztása és a pároztatás közötti idő elegendő legyen a hatások kimutathatóságához (31. pont). A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata rendszerint nem haladhatja meg az 1 ml/100 testtömeggramm mennyiséget, kivéve vizes oldatok esetén, amelyeknél legfeljebb 2 ml/100 testtömeggramm használható. Ennél nagyobb mennyiségek használatát (ha azt az állatjóléti tárgyú jogszabályok lehetővé teszik) meg kell indokolni. A koncentráció megfelelő beállításával kell minimalizálni a beadott térfogat variabilitását, és így kell biztosítani, hogy minden dózisnál azonos legyen a testtömegarányos térfogat.

Megfigyelések

29. A kísérleti állatok esetében általános klinikai megfigyeléseket kell tenni, és a klinikai tüneteket legalább naponta egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban rögzíteni kell, továbbá figyelembe kell venni az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Az adagolási időszakban naponta legalább kétszer meg kell vizsgálni az összes állatot morbiditás és mortalitás szempontjából. Minden állat tömegét le kell mérni a vizsgálat megkezdésekor, az ismételt dózisú vizsgálatok esetén hetente legalább egyszer, valamint az állatok végleges elaltatásakor. A felvett táplálék mennyiségét heti rendszerességgel le kell mérni. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag beadására az ivóvízzel együtt kerül sor, a vízfogyasztást minden vízcsere alkalmával és legalább hetente le kell mérni. A túlzott toxicitás nem halálos jeleit mutató állatokat a vizsgálati időszak befejezése előtt végleg el kell altatni (27).

A szövetek gyűjtése és feldolgozása

30. A nőstényeket a vemhesség második felében altatják el véglegesen, az egereket a vemhesség 13. napján, a patkányokat pedig a vemhesség 14–15. napján. Megvizsgálják, hogy tapasztalhatók-e méhükben domináns letális hatások, ehhez meghatározzák a beágyazódások, az élő és elhalt embriók, valamint a sárgatestek számát.

31. A méhszarvakat és a petefészkeket átvizsgálják, hogy megszámlálják a sárgatesteket, valamint eltávolítsák és megszámolják a magzatokat és megmérjék tömegüket. Ügyelni kell arra, hogy a méhen belül feltárják az élő magzatok által takart elhalásokat és meghatározzák számukat. A magzati mortalitást fel kell jegyezni. Rögzíteni kell emellett a sikeresen megtermékenyített nőstények számát, továbbá az összes beágyazódás, beágyazódás előtti veszteség és

▼M8

beágyazódás utáni mortalitás számát (a korai és kései felszívódásokkal egyetemben). A látható magzatok ezenfelül legalább két hétig tartósíthatók Bouin-féle rögzítőszerben, hogy meg lehessen vizsgálni a jelentősebb külső fejlődési rendellenességeket (28), ami kiegészítő adatokat szolgáltathat a vizsgálati anyag reprodukciót és fejlődést érintő hatásairól.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az eredmények feldolgozása

32. Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, bemutatva a pároztatott hímek számát, a vemhes nőstények számát, valamint a nem vemhes nőstények számát. Minden párzás eredményét egyedileg kell jelenteni, egyenként azonosítva a hímet és a nőstényt. A kezelt hímek esetében fel kell jegyezni a pároztatási időszakot és a dózist, és minden nőstény esetében fel kell jegyezni a beágyazódott élő és elhalt embriók számát.

33. A beágyazódás utáni veszteség kiszámításához meg kell határozni az elhalt és az összes beágyazódott embrió arányát a kezelt csoportban, majd össze kell vetni azt a vivőanyagos/oldószeres kontrollcsoport hasonló adatával.

34. A beágyazódás előtti veszteség a sárgatestek számának és a beágyazódások számának különbségéből vagy az egy nőstényre jutó átlagos beágyazódások számának a kontrollpároztatásokhoz viszonyított fogyatkozásából számítható ki. Ha vizsgálták a beágyazódás előtti veszteséget, azt is jelenteni kell.

35. A domináns letális tényező a következőképpen becsülhető meg: (beágyazódás utáni elhalálozások/összes beágyazódás nőstényenként) × 100.

36. A toxicitásra és a klinikai tünetekre vonatkozó adatokat (a 29. pont alapján) jelenteni kell.

Elfogadhatósági kritériumok

37. Az alábbi kritériumok határozzák meg a vizsgálat elfogadhatóságát:

— A párhuzamos negatív kontroll adatai összhangban vannak a negatív történeti kontrolladatokra vonatkozólag közzétett normákkal és – amennyiben rendelkezésre állnak – a laboratórium történeti kontrolladataival (lásd a 10. és a 18. pontot).

— A párhuzamos pozitív kontrollok olyan válaszreakciókat generálnak, amelyek összhangban vannak a pozitív történeti kontrolladatokra vonatkozólag közzétett normákkal és – amennyiben rendelkezésre állnak – a laboratórium pozitív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisával, továbbá a negatív kontrollhoz viszonyítva statisztikailag szignifikáns növekedést idéznek elő (lásd a 17. és a 18. pontot).

— Megfelelő számú beágyazódás és dózis képezte elemzés tárgyát (20. pont).

— A legmagasabb dózis kiválasztására vonatkozó kritériumok összhangban vannak a 24. és 27. pontban ismertetett kritériumoknak.

Az eredmények értékelése és értelmezése

38. Legalább három kezelt dóziscsoportot kell megvizsgálni annak érdekében, hogy elegendő adat álljon rendelkezésre a dózis–válasz elemzéshez.

▼M8

39. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha:

— legalább az egyik vizsgálati dózis statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva;

— a növekedés dózisfüggő legalább egy kísérleti körülménynél (például hetes pároztatási időszak) megfelelő vizsgálattal történő értékelés alapján; valamint

— ezen eredmények bármelyike kívül esik a negatív kontrolladatok elfogadható tartományán vagy a laboratórium negatív történeti kontrolladatainak eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken).

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes domináns letális mutációkat előidézni a kísérleti állatok csírasejtjeiben. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások leírását a 44. pont tartalmazza; a szakirodalomban további ajánlott statisztikai megközelítések találhatók (20) (21) (22) (24) (29). Az alkalmazott statisztikai teszteknek az állatot kell kísérleti egységnek tekinteniük.

40. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha:

— a vizsgálati dózisok egyike sem mutat statisztikailag szignifikáns növekedést a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva;

— egyik kísérleti körülmény sem mutat a dózissal összefüggő növekedést; valamint

— valamennyi eredmény a negatív kontrolladatok, vagy amennyiben rendelkezésre állnak, a laboratórium negatív történeti kontrolladatainak (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) tartományába esik.

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag nem képes domináns letális mutációkat előidézni a kísérleti állatok csírasejtjeiben.

41. Az egyértelműen pozitív vagy egyértelműen negatív válasz igazolása nem követelmény.

42. Ha a válasz nem egyértelműen negatív és nem is egyértelműen pozitív, illetve egy adott eredmény (például kismértékű vagy határesethez közelítő növekedés) biológiai relevanciája megállapításának segítése érdekében az adatokat szakértői véleménnyel és/vagy a meglévő kísérleti adatok további vizsgálataival kell értékelni, például meg kell határozni, hogy a pozitív eredmény kívül esik-e a negatív kontrolladatok elfogadható tartományán vagy a laboratórium történeti negatív kontrolladatain (30).

43. Ritka esetekben, az adatkészlet még további vizsgálatok után is eleve kizárja a pozitív vagy negatív eredményekre vonatkozó következtetést, ezért kétértelmű reakció lesz a következtetés.

44. Az alkalmazott statisztikai teszteknek a hím állatot kell kísérleti egységnek tekinteniük. Bár előfordulhat, hogy a számadatok (pl. az egy nőstényre jutó beágyazódások száma) a Poisson-féle eloszlás és/vagy az arányszámok (pl. az elhalt beágyazódott embriók aránya) a binominális eloszlás szerint alakul, az ilyen adatok gyakori jellemzője a túlszóródás (31). Ennek megfelelően a statisztikai elemzésnek először a túl- és alulszóródás mértékét kell tesztelnie, például a Cochran-féle binomiális variancia próbával (32) vagy a Tarone-féle, binominális túlszóródást vizsgáló C(α)-próbával (31) (33). Amennyiben nem mutatható ki eltérés a binomiális eloszlástól, az egyes dózisok egymáshoz való viszonyára vonatkozó trendek vizsgálhatók Cochran-Armitage-féle trendpróbával (34), a kontrollcsoporttal való páronkénti összehasonlításhoz pedig a Fisher-egzakt teszt használható (35).

▼M8

Hasonlóképpen, ha nem tapasztalható eltérés a Poisson-eloszlástól, a számok alakulásának trendjei vizsgálhatók Poisson-regresszióval (36), a kontrollcsoporttal történő páronkénti összevetéshez pedig alkalmazható a Poisson-modell páronkénti kontrasztanalízise (36). Ha az eloszlás szignifikánsan túl- vagy alulbecsült, a nem paraméteres módszerek használata ajánlott (23) (31). Ilyenek a rangsor alapú próbák, például a Jonckheere–Terpstra-féle trendpróba (37) és a vivőanyagos/oldószeres kontrollcsoporttal való páronkénti összehasonlítással végzett Mann–Whitney-féle próbák (38), továbbá a tendencia feltárására és a kontrollcsoporttal történő páronkénti összehasonlításra szolgáló permutációs, újra-mintavételezési és bootstrap-eljárások (31) (39).

45. A pozitív domináns letális vizsgálat bizonyítékát szolgáltatja annak, hogy a vizsgálati vegyi anyag genotoxicitást idéz elő a vizsgálathoz használt faj kezelt hímjének csírasejtjeiben.

46. A válaszreakció biológiai jelentőségének értékelésekor támpontot adhat annak mérlegelése, hogy a megfigyelt értékek a kontrollokkal kapott régebbi eredmények tartományába esnek-e (40).

Vizsgálati jelentés

47. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Összegzés.

Vizsgálati vegyi anyag:

— eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;

— adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

A vizsgálati vegyi anyag előkészítése:

— a vivőanyag megválasztásának indokolása;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert;

▼**M8**

— a takarmány-, ivóvíz- vagy inhalációs készítmények előkészítése;

— a készítmények analitikai meghatározásai (pl. stabilitás, homogenitás, névleges koncentráció), ha végeztek ilyen meghatározásokat.

Kísérleti állatok:

— a felhasznált faj/törzs és megválasztásuk indokolása;

— az állatok száma, kora és neme;

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.;

— az állatok egyedi azonosítására szolgáló módszerek;

— rövid távú vizsgálatok esetében: az egyes hím állatok testtömege a vizsgálat kezdetekor és végén, egy hétnél hosszabb vizsgálatok esetében: az egyes állatok testtömege a vizsgálat során és a táplálékfelvételük. A testtömegtartományt, az átlagot és a szórást minden egyes csoportnál meg kell adni.

Vizsgálati körülmények:

— a pozitív és negatív (vivőanyagos/oldószeres) kontrollok adatai;

— a dózistartomány-kereső vizsgálat adatai;

— a dózisok kiválasztásának indokolása;

— a vizsgálati vegyi anyag előkészítésének részletes ismertetése;

— a vizsgálati vegyi anyag beadására vonatkozó részletek;

— a beadási mód indokolása;

— az állati toxicitás mérésére szolgáló módszerek, beleértve adott esetben a kórszövettani vagy hematológiai elemzéseket, illetve az állatok megfigyelésének és a testtömeg mérésének gyakorisága;

— negatív eredmény esetén annak ellenőrzésére szolgáló módszerek, hogy a vizsgálati vegyi anyag elérte-e a célszövetet vagy az általános keringési rendszert;

— tényleges dózis (mg/testtömeg kg/nap) a vizsgálati vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjából (ppm) és a fogyasztásból számítva, ha alkalmazható;

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek;

— a ketrecek környezetgazdagítására vonatkozó részletek;

— a kezelési és mintavételi ütemtervek részletes leírása és kiválasztásuk indokolása;

— a fájdalomcsillapítás módja;

— az eutanázia módja;

▼M8

— a szövetek izolálására és tartósítására használt eljárások;

— valamennyi készlet és reagens beszerzési forrása és gyártási száma (ha elérhető);

— a domináns letális hatások számolására szolgáló módszerek;

— a pároztatási ütemterv;

— a párzás igazolására használt módszer;

— az eutanázia időpontja;

— a domináns letális hatások értékelésének kritériumai, többek között a sárgatestek, beágyazódások, felszívódások és beágyazódás előtti veszteségek, élő és elhalt beágyazódott embriók száma.

Eredmények:

— az állatok állapota a vizsgálati időszak előtt és alatt, beleértve a toxicitás jeleit;

— a hím egyedek testtömege a kezelési és pároztatási időszakok alatt;

— a pároztatott nőstények száma;

— a dózis-válasz összefüggés, ahol lehetséges;

— a párhuzamos és negatív történeti kontrolladatok tartományokkal, átlagértékekkel és szórásokkal;

— az egyidejűleg elvégzett pozitív kontrollokra vonatkozó adatok;

— az egyes anyaállatok táblázatba foglalt adatai: az egy anyaállatra jutó sárgatestek száma; az egy anyaállatra jutó beágyazódások száma; az egy anyaállatra jutó felszívódások és beágyazódás előtti veszteségek száma; az egy anyaállatra jutó élő beágyazódott embriók száma; az egy anyaállatra jutó elhalt beágyazódott embriók száma; a magzatok testtömege;

— a fenti adatok pároztatási időszakonkénti és dózisonkénti összefoglalása, a domináns letalitás gyakoriságával;

— statisztikai elemzések és alkalmazott módszerek.

Az eredmények értékelése.

Következtetés.

SZAKIRODALOM

(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, Párizs.

(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.) 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, 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.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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.), 334-336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston

(37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika,* 41:133-145.

(38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

▼**M8**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Sárgatest (corpus luteum): hormontermelő képződmény, amely a petefészekben alakul ki a petét kilökő tüsző helyén. A petefészkekben jelen lévő sárgatestek száma megegyezik a peteérés során keletkezett peték számával.

Domináns letális mutáció: a csírasejtben vagy a megtermékenyítést követően létrejövő mutáció, amely az embrió vagy a magzat elhalását okozza.

Termékenységi mutató: a pároztatott vemhes nőstények száma a pároztatott nőstények számához képest.

Pároztatási időszak: a kezelés vége és a kezelt hímek pároztatása között eltelő idő. Az időköz szabályozása révén felmérhetők a különböző csírasejttípusokra gyakorolt kémiai hatások. Az expozíció végét követő 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. és 8. hét során zajló egér pároztatásoknál mérhetők a spermiumot, kondenzált spermatidokat, kerek spermatidokat, pachitén spermatocitákat, korai spermatocitákat, differenciálódott spermatogóniumokat, differenciálódó spermatogóniumokat és csírasejt spermatogóniumokat ért hatások.

Beágyazódás előtti veszteség: a beágyazódások száma és a sárgatestek száma között különbség. Megbecsülhető a kezelt és a kontrollcsoportba beosztott nőstények összes beágyazódásainak összevetése alapján is.

Beágyazódás utáni veszteség: a kezelt csoport elhalt beágyazódásainak aránya összehasonlítva a kontrollcsoport összes beágyazódáshoz viszonyított elhalt beágyazódásaival.

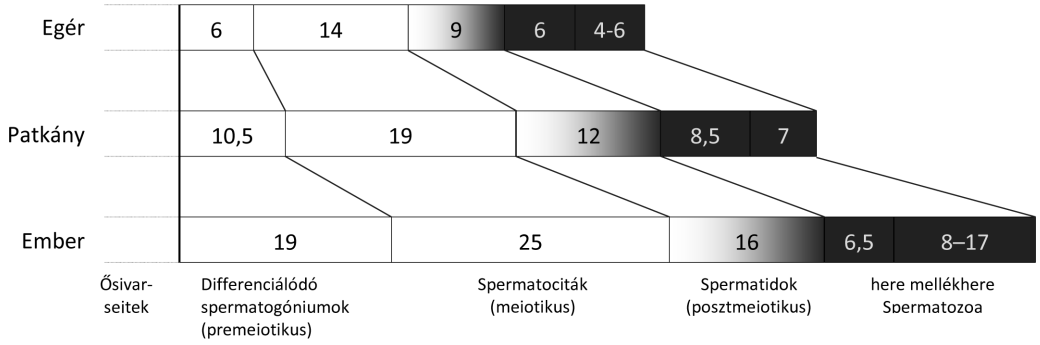
Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

▼**M8**

2. függelék

A SPERMATOGENEZIS IDEJE EMLŐSÖKNÉL



1. ábra: A hím csírasejt (napokban megadott) fejlődési idejének összevetése egér, patkány és ember között. Az árnyékolással jelzett időszakokban nem zajlik DNS-javítás.

A fentiekben látható az egérben, patkányban és emberben lezajló spermatogenezis sematikus ábrája (forrás: Adler, 1996). A nem differenciálódott spermatogóniumok közé tartoznak: A-szimpla; A-párosított; és A-összekapcsolt spermatogóniumok (Hess and de Franca, 2008). Az A-szimpla spermatogóniumokat tekintik a valódi ősivarsejteknek; ezért az ősivarsejtekre gyakorolt hatások felmérése érdekében (egereknél) legalább 49 napnak kell eltelnie a vizsgálati vegyi anyag utolsó beadása és a pároztatás között.

Hivatkozások

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. SPERMATOGONIÁLIS KROMOSZÓMARENDELLENESSÉG VIZSGÁLATA EMLŐSÖKÖN

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 483. vizsgálati iránymutatásával (2016). A vizsgálati módszereket a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és az állatok kíméletére irányuló megfontolások figyelembevételével rendszeresen felülvizsgálják. A vizsgálati módszer átdolgozott változata tükrözi a vizsgálat hosszú éveken keresztüli alkalmazása során szerzett tapasztalatokat, valamint felveti annak lehetőségét, hogy ezt a vizsgálatot beépítsék más toxicitási vagy genotoxicitási vizsgálatokba, vagy azokkal együtt alkalmazzák. A toxicitási vizsgálatok kombinálása lehetővé teheti a toxicitási vizsgálatokban használt állatok számának csökkentését. E vizsgálati módszer a genetikai toxikológiai vizsgálati módszerek sorozatának részét képezi. Az OECD kidolgozott egy, a genetikai toxikológiai vizsgálatokról tömör tájékoztatást nyújtó, az OECD genetikai toxikológiára vonatkozó vizsgálati iránymutatásainak közelmúltbeli változásait áttekintő dokumentumot (1).

2. A spermatogonális kromoszómarendellenesség emlősökön történő *in vivo* vizsgálatának célja azon vegyi anyagok azonosítása, amelyek strukturális kromoszóma-rendellenességeket okoznak emlősök spermatogoniális sejtjeiben (2), (3), (4). Ez a vizsgálat ezenfelül a genotoxicitás értékelése szempontjából is releváns, mert az *in vivo* metabolizmus, a farmakokinetikai és a DNS-hibajavító eljárások tényezői – jóllehet fajonként eltérnek – aktívak és hozzájárulnak a reakciókhoz. Ezt a vizsgálati módszert nem a számszerű rendellenességek mérésére tervezték; és nem is használják rutinszerűen erre a célra.

3. E vizsgálat kimutatja (mind a kromoszóma, mind a kromatid típusú) szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket az osztódó spermatogonális ivarsejtekben, ezért várhatóan előre jelezheti az ivarsejtek öröklődő mutációit.

4. A kulcsfontosságú fogalmak meghatározásai a függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

5. E vizsgálatban rendszerint rágcsálók használatosak, de egyes esetekben – amennyiben tudományosan indokolt – más fajok is megfelelőek lehetnek. A rágcsálók heréiből standard citogenetikai módszerekkel előállított készítmények mitotikus (spermiogoniális) és meiotikus (spermatocita) metafázist idéznek elő. A mitotikus és a meiotikus metafázis a kromoszómák morfológiája alapján határozható meg (4). Ez az *in vivo* citogenetikus vizsgálat észleli a szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket a spermatogonális mitózisokban. Más célsejtek nem képezik tárgyát e vizsgálati módszernek.

6. A spermatogóniumokban a kromatid típusú rendellenességek észleléséhez a kezelést követő első mitotikus sejtosztódást kell megvizsgálni, még mielőtt ezek a rendellenességek a következő sejtosztódások során kromoszóma típusú rendellenességekké alakulnának. A kezelt spermatocitákról további információk szerezhetők a diakinézis-metafázis I-ben és metafázis II-ben jelentkező szerkezeti kromoszóma-rendellenességek meiotikus kromoszóma-elemzésével.

▼M8

7. A herékben a spermatogóniumok számos generációja van jelen (5), és ezek a különböző ivarsejttípusok a kémiai kezeléssel szembeni érzékenység egész spektrumát átfoghatják. Így tehát az észlelt rendellenességek a kezelt spermatogónium-populációk halmozott válaszát jelentik. A herékből előállított készítményekben fellelhető mitotikus sejtek többsége B spermatogónium, amelyek megközelítőleg 26 órás sejtciklussal rendelkeznek (3).

8. Ha létezik arra vonatkozó bizonyíték, hogy a vizsgálati vegyi anyag vagy annak metabolitja(i) nem éri(k) el a herét, ez a vizsgálat nem megfelelő.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

9. Általában az állatokat megfelelő expozíciós úton kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal, majd a kezelés után megfelelő időpontban eutanáziát hajtanak végre rajtuk. Az eutanázia előtt az állatokat metafázis-blokkoló szerrel (például kolchicinnel vagy Colcemid®-del) kezelik. Ezután kromoszómapreparátumot hoznak létre az ivarsejtekből és megfestik azokat, majd a metafázisban lévő sejtek elemzésével megállapítják a kromoszómaaberrációkat.

A LABORATÓRIUM JÁRTASSÁGÁNAK IGAZOLÁSA

10. A vizsgálatban való jártasság igazolása érdekében a laboratóriumoknak bizonyítottan képesnek kell lenniük reprodukálni a spermatogónium szerkezeti kromoszóma-rendellenességeinek gyakoriságára vonatkozó várható eredményeket pozitív kontrollként szolgáló – például az 1. táblázatban felsorolt – anyagokkal (ideértve a gyenge reakciókat is), valamint a negatív kontrollokból származó adatoknak olyan gyakoriságot kell mutatniuk, amely összhangban áll a szakirodalomban (pl. (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10)) közzétett elfogadható adattartománnyal vagy a laboratóriumi kontrollok történeti szórásával, ha vannak történeti adatok.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Az állatfaj kiválasztása

11. Egészséges, fiatal, ivarérett, általánosan használt laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni. Rendszerint hím egereket használnak; ugyanakkor más megfelelő emlős fajok hímjei is alkalmazhatók, amennyiben az tudományosan indokolt, és lehetővé teszi a vizsgálatnak egy eltérő vizsgálati módszerrel való együttes alkalmazását. Rágcsálóktól eltérő fajok használatának tudományos indokolását közölni kell a jelentésben.

Az állatok tartásának és etetésének körülményei

12. Rágcsálók esetében a kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének 22°C-nak (±3°C) kell lennie. Bár ideális esetben a helyiség relatív páratartalmának 50–60 %-nak kell lennie, legyen legalább 40 %, és a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltakozásával. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgálati vegyi anyaggal való megfelelő keveredés szükségessége is befolyásolhatja, ha a vizsgálati vegyi anyag beadása ilyen módon történik. Ha agresszív viselkedés nem várható, a rágcsálókat kis csoportokban, lehetőleg szilárd aljú, megfelelő környezetgazdagítással ellátott ketrecekben kell tartani (ketrecenként legfeljebb öt egyed tartható). Ha tudományos szempontból indokolt, az állatok egyedileg is elhelyezhetők.

▼M8

Az állatok előkészítése

13. A rendszerint egészséges, fiatal, felnőtt (a kezelés kezdetén 8–12 hetes) állatokat használnak, és véletlenszerűen osztják be a kontroll- és a kezelt csoportokba. Az egyes állatokat humánus, minimálisan invazív módszerrel (például gyűrűzéssel, címkézéssel, mikrocsip beültetésével vagy biometrikus azonosítással, de a fül vagy a lábujj kilyukasztása nélkül) egyedi azonosítóval kell ellátni, és legalább öt napig szoktatni kell a laboratóriumi körülményekhez. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek a ketrec elhelyezéséből adódó esetleges hatások. A pozitív kontrollal és a vizsgálati vegyi anyaggal való keresztszennyeződés kerülendő. A vizsgálat kezdetén az egyes állatok tömege közötti eltérésnek minimálisnak kell lennie és nem haladhatja meg a ±20 %-ot.

A dózisok előkészítése

14. Az állatoknak történő adagolás előtt a szilárd halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni kell megfelelő oldószerben vagy vivőanyagban, vagy bele kell keverni a takarmányba vagy az ivóvízbe. A folyékony vizsgálati vegyi anyagok közvetlenül adagolhatók vagy az adagolás előtt hígíthatók. Belélegzéses expozíció esetén a vizsgálati vegyi anyagok fizikai-kémiai tulajdonságaiktól függően gáz, gőz vagy szilárd/folyadék aeroszol formában adagolhatók. A vizsgálati vegyi anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve akkor, ha a stabilitási adatok bizonyítják a tárolás elfogadhatóságát és meghatározzák a megfelelő tárolási feltételeket.

Vizsgálati körülmények – oldószer/vivőanyag

15. Az oldószer/vivőanyag nem okozhat toxikus hatásokat az alkalmazott dózisok mellett, és nem alkalmazható olyan oldószer/vivőanyag, amely képes kémiai reakcióba lépni a vizsgálati vegyi anyagokkal. Jól ismert oldószerektől eltérő oldószerek/vivőanyagok alkalmazása esetén azok használatát alá kell támasztani a kompatibilitásukat jelző referenciaadatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát kell megfontolni. Általánosan használt, kompatibilis oldószer/vivőanyag például többek között a víz, a fiziológiás sóoldat, a metil-cellulóz-oldat, a karboximetil-cellulóz-nátriumsó-oldat, az olívaolaj és a kukoricaolaj. Ha nem állnak rendelkezésre olyan történeti vagy publikált kontrolladatok, amelyek igazolják, hogy a választott atipikus oldószer/vivőanyag nem idéz elő szerkezeti kromoszóma-rendellenességet vagy más káros hatást, az oldószeres/vivőanyagos kontroll elfogadhatóságának megállapítása érdekében előzetes vizsgálatot kell végezni.

Pozitív kontrollok

16. Egyidejűleg alkalmazott pozitív kontrollállatokat mindig kell alkalmazni, kivéve ha a laboratórium igazolta a vizsgálat lebonyolításában szerzett jártasságát, és a közelmúltban (például az elmúlt 5 évben) rutinszerűen használta a vizsgálatot. Párhuzamos pozitív kontrollcsoport hiányában minden egyes kísérletben értékelési kontrollokat (fixált és megfestetlen tárgylemezeket) kell alkalmazni. Ezek oly módon kaphatók meg, hogy a vizsgálat értékelésébe beszámítják a vizsgálat lebonyolítása szerinti laboratóriumban rendszeres időközönként (például 6–18 hónaponként) – például a jártasság vizsgálata során, vagy szükség esetén azt követően rendszeresen – pozitív kontrollokkal végzett különálló kísérlettel létrejött és tárolt megfelelő referenciamintákat.

17. A pozitív kontrollként szolgáló anyagoknak megbízható módon ki kell váltaniuk a szerkezeti kromoszóma-rendellenességekkel rendelkező sejtek spontán szinthez képest kimutathatóan gyakoribbá válását. A pozitív kontrollok dózisát úgy kell megválasztani, hogy a hatások egyértelműek legyenek, de az értékelő ne tudja beazonosítani azonnal a kódolt mintákat. A pozitív kontrollként szolgáló anyagokra az 1. táblázat tartalmaz példákat.

▼M8

1. táblázat

Példák pozitív kontrollként szolgáló anyagokra

Anyag [CAS-szám] (referenciaszám)
Ciklofoszfamid (monohidrát) [CAS-szám: 50-18-0 (CAS-szám 6055-19-2)] (9)
Ciklohexil-amin [CAS-szám: 108-91-8] (7)
Mitomicin C [CAS-szám: 50-07-7] (6)
Akrilamid monomer (CAS-szám: 79-06-1] (10)
Trietilén-melamin [CAS-szám: 51-18-3] (8)

Negatív kontrollok

18. Minden mintavételi időpontban negatív kontrollállatokat is kell használni, amelyeket csak oldószerrel vagy vivőanyaggal kezeltek, és a kezelésük egyébiránt ugyanolyan módon történik, mint a kezelési csoportoké. Ha nem állnak rendelkezésre olyan történeti vagy publikált kontrolladatok, amelyek igazolják, hogy a választott oldószer/vivőanyag nem idéz elő kromoszóma-rendellenességeket vagy más káros hatásokat, a vivőanyagos kontroll elfogadhatóságának megállapítása érdekében nem kezelt kontrollállatokat is alkalmazni kell minden mintavételi időpontban.

ELJÁRÁS

Az állatok száma

19. A vizsgálat megkezdésekor a csoportok méretét úgy kell megállapítani, hogy egy csoportban legalább öt hím állat legyen. Ez a csoportonkénti állatszám elegendőnek tekinthető ahhoz, hogy megfelelő mértékű statisztikai kiértékelést lehessen végezni (vagyis általában észlelni lehessen a kromoszóma-rendellenesség gyakoriságának legalább megduplázódását, amikor a negatív kontrollszint 0,05-ös szignifikanciaszint melletti 80 %-os valószínűségnél legalább 1,0 %) (3) (11). Útmutatás az állatok maximális számára vonatkozó tipikus követelményhez: a három dóziscsoporttal és egy párhuzamos negatív kontrollcsoporttal, továbbá egy pozitív kontrollcsoporttal (amelyek mindegyike csoportonként öt állatból áll) két mintavételi időpontban végzett vizsgálathoz 45 állatra lenne szükség.

A kezelés ütemterve

20. A vizsgálati vegyi anyagot rendszerint egyetlen adagban adják be (egyszeri kezelés keretében); alkalmazható más adagolási rend is, amennyiben használata tudományos szempontból indokolt.

21. A legnagyobb adaggal kezelt csoportnál a kezelés után két különböző időpontban mintát kell venni. Mivel a vizsgálati vegyi anyag(ok) felvételéhez és anyagcseréjéhez szükséges idő, valamint annak (azoknak) a sejtciklus-kinetikára gyakorolt hatása befolyásolhatja a kromoszóma-rendellenesség kimutatásának optimális időpontját, egy korai és egy későbbi mintavételt végeznek a kezelést követően körülbelül 24 és 48 órával. A legmagasabb dózisoktól eltérő dózisok esetén korai időpontban, a kezelés után 24 órával kell mintát venni (ami megegyezik a B spermatogóniumok sejtciklusának idejével vagy annál rövidebb, így nagyobb valószínűséggel értékelhetők a kezelés utáni első metafázisok), kivéve ha más időpontról bebizonyosodott, hogy az megfelelőbb.

22. Más mintavételi idők is alkalmazhatók. Olyan vegyi anyagok esetében például, amelyek S fázistól független hatásokat fejtenek ki, megfelelőbbnek bizonyulhatnak a 24 óránál rövidebb mintavételi idők is.

▼M8

23. Ismételt dózisú kezelési eljárás is használható, például ha a vizsgálat elvégzésére egy másik végpontot érintő, 28 napig tartó beadási időszakot alkalmazó vizsgálattal (pl. a B.58. vizsgálati módszerrel) összefüggésben kerül sor; ez esetben azonban a mintavételi időszakok különbözősége miatt további állatcsoportok bevonására lenne szükség. Ennek megfelelően az ilyen ütemtervek megfelelőségét eseti alapon kell tudományos érvekkel alátámasztani.

24. Az eutanázia előtt az állatok hasüregébe adott injekcióval megfelelő adag metafázist blokkoló vegyi anyagot (például Colcemid®-et vagy kolchicint) fecskendeznek be. Ezután az állatokból megfelelő időközönként mintákat kell venni. Egerek és patkányok esetében ez az időköz körülbelül 3–5 óra.

Dózisok

25. Ha előzetes dózistartomány-kereső vizsgálatra kerül sor amiatt, hogy nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok a dózisok kiválasztásának segítéséhez, azt ugyanazon laboratóriumban, ugyanazon fajok, törzsek és kezelési eljárások alkalmazásával kell végrehajtani, mint amelyek a fő vizsgálatban alkalmazandóak, a dóziskereső vizsgálat végrehajtására vonatkozó ajánlások szerint (12). E vizsgálatnak a maximális tolerálható dózis (MTD) meghatározására kell irányulnia, amely a vizsgálati időszak hosszához képest enyhe toxikus hatásokat kiváltó dózis (például rendellenes viselkedést vagy reakciókat, enyhe testtömeg-csökkenést vagy vérképzőrendszert érintő citotoxicitást vált ki), de amely elhullást, illetve az állatok végleges elaltatását szükségessé tévő, bizonyított fájdalmat, szenvedést vagy stresszt nem idéz elő.

26. A legmagasabb adag olyan adagként is definiálható, amely létrehoz valamilyen toxicitási jelet a spermatogóniumokban (például az első és második meiotikus metafázis esetében a spermatogonális mitózis arányának csökkenése). E csökkenés nem haladhatja meg az 50 %-ot.

27. A kis, nem mérgező dózisban specifikus biológiai aktivitást mutató vizsgálati vegyi anyagok (mint például a hormonok és a mitogének), valamint azok a vegyi anyagok, amelyek a toxikokinetikai tulajdonságok telítődését mutatják, kivételek lehetnek a dózismeghatározási követelmények alól, és eseti alapon kell azokat értékelni.

28. Annak érdekében, hogy dózis-válasz adatokat lehessen szerezni, a teljes vizsgálatnak egy negatív kontrollcsoportot (18. pont), valamint legalább három dózist kell tartalmaznia, ahol a dózisok közötti szorzótényező általában 2, de legfeljebb 4. Ha a vizsgálati vegyi anyag nem okoz toxicitást a dózistartomány-kereső vizsgálatban vagy meglévő adatok alapján, egyszeri adagolás esetén a legmagasabb dózisnak 2 000 mg/testtömegkilogrammnak kell lennie. Ha azonban a vizsgálati vegyi anyag toxicitást okoz, az MTD-nek a beadott legmagasabb dózisnak kell lennie, és az alkalmazott dózisok lehetőleg fedjék le a maximálistól az alacsony mértékű toxicitást okozó vagy toxicitást egyáltalán nem okozó dózisig terjedő tartományt. Ha a célszövet (vagyis a here) toxicitása valamennyi vizsgált dózisnál megfigyelhető, érdemes nem toxikus dózisoknál további vizsgálatot végezni. A mennyiségi dózis-válasz adatok teljesebb körű jellemzését célzó vizsgálatok további dóziscsoportokat tehetnek szükségessé. Ezek a határértékek a vizsgálati vegyi anyagok bizonyos, külön követelmények hatálya alá tartozó típusai (például a humán gyógyszerek) esetében változóak lehetnek. Ha a vizsgálati vegyi anyag toxicitást okoz, a legmagasabb dózist és két alacsonyabb dózist kell kiválasztani (a fentiek szerint). Legalább 14 napig tartó beadási időszak esetén a legmagasabb dózisnak 1 000 mg/testtömeg kg/napnak, 14 napnál rövidebb beadási időszak esetében pedig 2 000 mg/testtömeg kg/napnak kell lennie.

▼M8

A dózisok beadása

29. Az emberi expozíció várható útját figyelembe kell venni a vizsgálat tervezése során. Ezért az egyéb expozíciós utak (például takarmány, ivóvíz, topikális szubkután, intravénás, orális (gyomorszondával), inhalációs vagy implantáció) is kiválaszthatók indokoltként. Az utat mindenesetre úgy kell kiválasztani, hogy biztosítsa a célszövet megfelelő expozícióját. A hasüregbe adott injekció tudományos indokolás hiányában általában nem ajánlott, mivel az fiziológiai szempontból nem releváns emberi expozíciós út. Ha a vizsgálati vegyi anyagot a takarmányba vagy ivóvízbe keverik, különösen egyszeri adagolás esetén ügyelni kell arra, hogy a táplálék és a víz fogyasztása és a mintavétel közötti idő elegendő legyen a hatások kimutathatóságához (lásd a 33. pontot). A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata rendszerint nem haladhatja meg az 1 ml/100 testtömeggramm mennyiséget, kivéve vizes oldatok esetén, amelyeknél legfeljebb 2 ml/100 testtömeggramm használható. Ennél nagyobb mennyiségek használatát (ha azt az állatjóléti tárgyú jogszabályok lehetővé teszik) meg kell indokolni. A koncentráció megfelelő beállításával kell minimalizálni a beadott térfogat variabilitását, és így kell biztosítani, hogy minden dózisnál azonos legyen a testtömegarányos térfogat.

Megfigyelések

30. A kísérleti állatok esetében általános klinikai megfigyeléseket kell tenni, és a klinikai tüneteket legalább naponta egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban rögzíteni kell, továbbá figyelembe kell venni az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Naponta legalább kétszer meg kell vizsgálni az összes állatot morbiditás és mortalitás szempontjából. Minden állat tömegét le kell mérni a vizsgálat megkezdésekor, az ismételt dózisú vizsgálatok esetén hetente legalább egyszer, valamint az állatok végleges elaltatásakor. A legalább egy hétig tartó vizsgálatok során a felvett táplálék mennyiségét legalább heti rendszerességgel le kell mérni. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag beadására az ivóvízzel együtt kerül sor, a vízfogyasztást minden vízcsere alkalmával és legalább hetente le kell mérni. A túlzott toxicitás nem halálos jeleit mutató állatokat a vizsgálati időszak befejezése előtt el kell altatni (13).

Kromoszómapreparálás

31. Közvetlenül az eutanázia után ivarsejt-szuszpenziót vesznek egyik vagy mindkét heréből, majd hipotóniás oldatba helyezik és ismert protokollok szerint – például (2) (14) (15) – fixálják azokat. A sejteket ezután tárgylemezre kenik és megfestik (16) (17). Valamennyi tárgylemezt kóddal kell ellátni, hogy az értékelő ne tudja beazonosítani azokat.

Elemzés

32. Minden egyes állatnál legalább 200 jól szétterült metafázist kell elemezni (3) (11). Amennyiben a negatív történeti kontrolladatok 1 % alatti gyakoriságot mutatnak, a statisztikai értékelés növelése érdekében egyedenként több mint 200 sejtet kell értékelni. Olyan festési módszereket kell alkalmazni, amelyek lehetővé teszik a centromer azonosítását.

33. A kromoszóma és a kromatid típusú rendellenességeket külön-külön kell feljegyezni és altípusonként (törések, kicserélődések) kell besorolni. A Gep-eket fel kell jegyezni, de nem kell figyelembe venni annak meghatározásakor, hogy egy adott vegyi anyag előidézi-e a kromoszóma-rendellenességet mutató sejtek számának szignifikáns növekedését. A laboratóriumban alkalmazott eljárásoknál biztosítani kell, hogy a kromoszóma-rendellenességeket jól

▼M8

képzett
értékelők elemezzék, Mivel a tárgylemezek elkészítésére szolgáló eljárások következtében gyakran kiértékelhetetlen a metafázisok bizonyos hányada, mert az eljárás kromoszómaveszteséget okoz, a sejteket a centromerszám alapján kell értékelni, ami a kiértékelt sejteknél nem lehet kevesebb mint $2n\pm2$, ahol az n az adott fajra jellemző haploid kromoszómaszám.

34. Bár a vizsgálat célja a szerkezeti kromoszóma-rendellenességek észlelése, fontos feljegyezni a poliploid sejtek és az endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejtek előfordulásának gyakoriságát, amennyiben láthatók ilyen sejtek (44. pont).

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az eredmények feldolgozása

35. Az egyes állatok adatait táblázat formájában kell megadni. Minden egyes állat esetében értékelni kell a szerkezeti kromoszómaaberrációval/-aberrációkkal rendelkező sejtek számát és a sejtenkénti kromoszóma-rendellenességek számát. Az altípusonként (törések, kicserélődések) besorolt, kromatid és kromoszóma típusú rendellenességeket külön-külön kell felsorolni, megadva a számukat és a gyakoriságukat a kísérleti és a kontrollcsoportok esetében. A Gap-eket külön kell feljegyezni. A Gap-ek gyakoriságát bele kell foglalni a jelentésbe, de általában nem kell szerepeltetni az összes szerkezeti kromoszóma-rendellenesség gyakoriságának elemzésében. A poliploid és az endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejtek százalékos arányát észlelés esetén a jelentésbe kell foglalni.

36. A toxicitásra és a klinikai tünetekre vonatkozó adatokat (a 30. pont alapján) jelenteni kell.

Elfogadhatósági kritériumok

37. Az alábbi kritériumok határozzák meg a vizsgálat elfogadhatóságát:

— A párhuzamos negatív kontroll adatai összhangban vannak a negatív történeti kontrolladatokra vonatkozó közzétett normákkal (amelyek alapján a kromoszóma-rendellenességgel rendelkező sejtek aránya várhatóan > 0 % és $\leq 1{,}5$ %) és – amennyiben rendelkezésre állnak – a laboratórium történeti kontrolladataival (lásd a 10. és a 18. pontot).

— A párhuzamos pozitív kontrollok olyan válaszokat generálnak, amelyek összhangban vannak a pozitív történeti kontrolladatokra vonatkozólag közzétett normákkal és – amennyiben rendelkezésre áll – a laboratórium pozitív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisával, továbbá a negatív kontrollhoz viszonyítva statisztikailag szignifikáns növekedést idéznek elő (lásd a 17. és a 18. pontot).

— Megfelelő számú sejt és dózis képezte elemzés tárgyát (lásd a 28. és a 32. pontot).

— A legmagasabb dózis kiválasztására vonatkozó kritériumok összhangban vannak a 25. és 26. pontban ismertetett legmagasabb dózisokkal.

38. Ha mitózist és meiózist egyaránt tapasztalnak, meg kell határozni a spermatogonális mitózisok első és második meiotikus metafázishoz viszonyított arányát, állatonként 100 osztódó sejt összes mintájában valamennyi kezelt és negatív kontrollállathoz tartozó citotoxicitás méréseként. Ha csak mitózist figyelnek meg, a mitózisindexet állatonként legalább 1 000 sejtben kell meghatározni.

Az eredmények értékelése és értelmezése

39. Legalább három kezelt dóziscsoportot kell megvizsgálni annak érdekében, hogy elegendő adat álljon rendelkezésre a dózis–válasz elemzéshez.

▼**M8**

40. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha:

— legalább az egyik vizsgálati dózis statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva;

— a növekedés legalább egy mintavételi időpont tekintetében összefügg a dózissal; valamint

— ezen eredmények bármelyike kívül esik a negatív kontrolladatok elfogadható tartományán vagy a laboratórium negatív történeti kontrolladatainak eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken).

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes kromoszóma-rendellenességeket előidézni a vizsgált állatok spermatogóniumaiban. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások a szakirodalomban is megtalálhatók (11) (18). Az alkalmazott statisztikai teszteknek az állatot kell kísérleti egységnek tekinteniük.

41. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha:

— a vizsgálati dózisok egyike sem mutat statisztikailag szignifikáns növekedést a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva;

— egyik kísérleti körülmény sem mutat a dózissal összefüggő növekedést; valamint

— valamennyi eredmény a negatív kontrolladatok, vagy amennyiben rendelkezésre állnak, a laboratórium negatív történeti kontrolladatainak (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) tartományába esik.

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag nem képes kromoszóma-rendellenességeket előidézni a vizsgált állatok spermatogóniumaiban. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások a szakirodalomban is megtalálhatók (11) (18). A negatív eredmény nem zárja ki annak lehetőségét, hogy a vegyi anyag kromoszóma-rendellenességet vagy génmutációt idéz elő a fejlődés egy későbbi, a vizsgálat tárgykörén kívül eső fázisában.

42. Az egyértelműen pozitív vagy egyértelműen negatív válasz igazolása nem követelmény.

43. Ha a válasz nem egyértelműen negatív és nem is egyértelműen pozitív, illetve egy adott eredmény (például kismértékű vagy határesethez közelítő növekedés) biológiai relevanciája megállapításának segítése érdekében az adatokat szakértői véleménnyel és/vagy a meglévő kísérleti adatok további vizsgálataival kell értékelni, például meg kell határozni, hogy a pozitív eredmény kívül esik-e a negatív kontrolladatok elfogadható tartományán vagy a laboratórium negatív történeti kontrolladatain (19).

44. Ritka esetekben, az adatkészlet még további vizsgálatok után is eleve kizárja a pozitív vagy negatív eredményekre vonatkozó következtetést, ezért kétértelmű reakció lesz a következtetés.

45. A poliploid sejtek számának növekedése azt jelezheti, hogy a vizsgálati vegyi anyag potenciálisan gátolhatja a mitotikus folyamatokat és számszerű kromoszóma-rendellenességet idézhet elő (20). Az endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejtek számának növekedése azt jelezheti, hogy a vizsgálati vegyi anyag potenciálisan gátolhatja a sejtciklus előrehaladását (21) (22), ami más mechanizmus révén idéz elő számszerű kromoszóma-rendellenességet, mint a mitotikus folyamatok gátlása (lásd a 2. pontot). Ezért a poliploid sejtek és az endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejtek előfordulását külön-külön kell feljegyezni.

▼M8

Vizsgálati jelentés

46. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Összegzés.

Vizsgálati vegyi anyag:

— eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;

— adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

A vizsgálati vegyi anyag előkészítése:

— a vivőanyag megválasztásának indokolása;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban;

— a takarmány-, ivóvíz- vagy inhalációs készítmények előkészítése;

— a készítmények analitikai meghatározásai (pl. stabilitás, homogenitás, névleges koncentráció), ha végeztek ilyen meghatározásokat.

Kísérleti állatok:

— a felhasznált faj/törzs és a felhasználásuk indokolása;

— az állatok száma és életkora,

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.;

— az állatok egyedi azonosítására szolgáló módszerek;

— rövid távú vizsgálatok esetében: az egyes állatok testsúlya a vizsgálat kezdetekor és végén; egy hétnél hosszabb vizsgálatok esetében: az egyes állatok testtömege a vizsgálat során és a táplálékfelvételük. A testtömegtartományt, az átlagot és a szórást minden egyes csoportnál meg kell adni.

Vizsgálati körülmények:

— a pozitív és negatív (vivőanyagos/oldószeres) kontrollok adatai;

▼**M8**

— a dózistartomány-kereső vizsgálatból kapott adatok, ha történt ilyen vizsgálat;

— a dózisok kiválasztásának indokolása;

— a beadási mód indokolása;

— a vizsgálati vegyi anyag előkészítésének részletes ismertetése;

— a vizsgálati vegyi anyag beadására vonatkozó részletek;

— a kiválasztott elpusztítási időpontok indokolása;

— az állati toxicitás mérésére szolgáló módszerek, beleértve adott esetben a kórszövettani vagy hematológiai elemzéseket, illetve az állatok megfigyelésének és a testtömeg mérésének gyakorisága;

— negatív eredmény esetén annak ellenőrzésére szolgáló módszerek, hogy a vizsgálati vegyi anyag elérte-e a célszövetet vagy az általános keringési rendszert;

— tényleges dózis (mg/testtömeg kg/nap) a vizsgálati vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjából (ppm) és a fogyasztásból számítva, ha alkalmazható;

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek;

— a kezelési és mintavételi ütemtervek részletes leírása és kiválasztásuk indokolása;

— az eutanázia módja;

— a fájdalomcsillapítás módja (amennyiben alkalmaznak ilyet);

— a szövetek izolálására használt eljárások;

— metafázis-blokkoló vegyi anyag azonosítása, annak koncentrációja és kezelési időtartama;

— a tárgylemez preparálásának módszerei;

— a rendellenességek értékelésének kritériumai;

— az elemzett sejtek száma (állatonként);

— azon kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e.

Eredmények:

— az állatok állapota a vizsgálati időszak előtt és alatt, beleértve a toxicitás jeleit;

— az állatok testsúlya és szerveik tömeg a terminálláskor (több kezelés esetén a kezelési eljárás során mért testsúlyok);

— toxicitás jelei;

— mitotikus index;

— spermatogóniummitózisok aránya az első és második meiotikus metafázishoz viszonyítva, vagy a célszövet expozíciójának egyéb bizonyítéka;

— rendellenességek száma és típusa az egyes állatokban;

— a rendellenességek csoportonkénti száma összesen, átlagokkal és szórással;

▼**M8**

— a rendellenességeket mutató sejtek csoportonkénti száma átlagokkal és szórással;

— a dózis-válasz összefüggés, ahol lehetséges;

— statisztikai elemzések és alkalmazott módszerek;

— az egyidejűleg elvégzett negatív kontrollokra vonatkozó adatok;

— negatív történeti kontrolladatok, a tartományok, az átlagok, a szórás és a 95 %-os konfidenciaintervallum (ha rendelkezésre áll) megadásával, vagy a vizsgálati eredmények elfogadhatóságának megállapításához használt, publikált negatív történeti kontrolladatok;

— az egyidejűleg elvégzett pozitív kontrollokra vonatkozó adatok;

— a ploidia változásai, ha észlelhetők, beleértve a poliploid és/vagy endoreduplikált sejtek gyakoriságát.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

(4) Russo, A. (2000). *In vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379.Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(7) Cattanach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

▼M8

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313-324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

(12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

(13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

(16) Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

(21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

▼M8

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Aneuploidia: a normális diploid (vagy haploid) kromoszómaszámtól egyetlen kromoszómával vagy egynél több, szám feletti kromoszómával, de nem teljes kromoszómakészlettel (kromoszómakészletekkel) (poliploidia) való bármely eltérés.

Centroméra: olyan kromoszóma-régió(k), amely(ek)hez a sejtosztódás során orsórostok kötődnek, lehetővé téve a leánykromoszómáknak az utódsejtek pólusai felé irányuló szabályos mozgását.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Kromoszómasokféleség: a kromoszómák alakjában (pl. metacentrikus, akrocentrikus stb.) és méretében megfigyelhető változatosság.

Kromatid típusú rendellenesség: olyan szerkezeti kromoszómakárosodás, amely a különálló kromatidok törésében vagy a kromatidok közötti törésben és újraegyesülésben nyilvánul meg.

Kromoszóma típusú rendellenesség: olyan szerkezeti kromoszómakárosodás, amely a két kromatid azonos helyén történt törésében, vagy törésében és újraegyesülésében nyilvánul meg.

Klasztogén: bármely olyan vegyi anyag, amely sejtek vagy szervezetek populációjában szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket okoz.

Gap: egyetlen kromatid szélességénél kisebb és a kromatidok minimális átrendeződését okozó akromatikus lézió.

Genotoxikus: olyan általános kifejezés, amely magában foglalja a DNS- vagy kromoszómakárosodás valamennyi típusát, köztük a töréseket, a deléciókat, az adduktok képződését, a nukleotidok módosulását és kapcsolódását, az átrendeződéseket, a mutációkat, a kromoszómaaberrációkat és az aneuploidiát. A genotoxikus hatás nem minden típusa eredményez mutációkat vagy stabil kromoszómakárosodást.

Mitotikus index (MI): a metafázisban lévő sejtek és a sejtpopuláció összes sejtjének aránya; e populáció proliferációja mértékének jelzése.

Mitózis: a sejtmag osztódása, amely általában profázisra, prometafázisra, metafázisra, anafázisra és telofázisra osztható fel.

Mutagén: örökletes elváltozást idéz elő a génekben lévő DNS-bázispár-szekvenciá(k)ban vagy a kromoszómák szerkezetében (kromoszómaaberrációk).

Számszerű rendellenesség: a kromoszómák számának eltérése a felhasznált állatokra jellemző normál számértéktől.

Poliploidia: a haploid kromoszómaszám (*n*) egészszámú, de nem diploid (azaz *3n*, *4n* és így tovább) megsokszorozódása.

Szerkezeti rendellenesség: a sejtosztódás metafázisának mikroszkopikus vizsgálata során – deléciókként, fragmensekként és kicserélődésekként – észlelhető változás a kromoszóma szerkezetében.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

▼M7

▼B

B.25. EGÉREN VÉGZETT ÖRÖKLETES TRANSZLOKÁCIÓS VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az egéren végzett örökletes transzlokációs vizsgálat az első utódnemzedékből kinyerhető szerkezeti és számbeli kromoszómaváltozásokat mutatja ki. A kimutatott kromoszómaváltozások típusai a reciprok transzlokáció és – ha nőstény utódokat is vizsgálunk – az X-kromoszóma-veszteség. A transzlokáció-hordozók és az XO-nőstények csökkent termékenységgel rendelkeznek, ezen állatokat az F1 utódnemzedékből ennek alapján válogatjuk ki a citogenetikai elemzéshez. Bizonyos transzlokáció-típusok teljes sterilitást eredményeznek (X-autoszóma és c-t típus). A transzlokációk citogenetikai vizsgálattal hím állatok (vagy F1 hímek vagy F1 nőstények hím utódai) meiotikus sejtjeiben a diakinézis-I. metafázisban figyelhetők meg. Az XO-nőstények a csontvelői sejtek mitózisa során megfigyelhető, mindössze 39 kromoszóma jelenléte alapján azonosíthatók.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Ahol lehet, a vizsgált anyagokat izotóniás sóoldatban kell feloldani vagy szuszpendálni. A vízben oldhatatlan vegyi anyagokat a megfelelő vivőanyagban lehet feloldani vagy szuszpendálni. A vizsgált vegyi anyag friss készítményeit kell használni. Az alkalmazott vivőanyag nem lehet hatással a vizsgált anyagra, és nem okozhat toxikus hatást.

Az adagolás módja

A vizsgált anyagot orális intubálással vagy intraperitoneális injekcióval kell bejuttatni. Más alkalmazási módok is megfelelőek lehetnek.

A kísérlethez felhasznált állatok

A tenyésztés megkönnyítése és a citológiai megerősítő vizsgálatok miatt e vizsgálatokat egereken végzik. Nincs szükség különleges egértörzsre. Mindazonáltal a törzs átlagos alomszáma nyolcnál nagyobb és viszonylag állandó legyen.

Egészséges, ivarérett állatokra van szükség.

▼B

Az állatok száma és neme

Az állatok száma a spontán transzlokáció gyakoriságától és a pozitív eredmény eléréséhez szükséges minimális indukciós aránytól függ.

A vizsgálatot rendszerint F1 hím utódok elemzésével végzik. Dózisonként legalább 500 hím F1 utódot kell megvizsgálni. Ha F1 nőstény utódokat is használunk, 300 hímre és 300 nőstényre van szükség.

Negatív és pozitív kontrollok alkalmazása

Egyidejűleg végzett vizsgálatokból és történeti kontrollvizsgálatokból megfelelő kontrolladatoknak kell rendelkezésre állniuk. Ha nemrégen ugyanezen laboratóriumban elvégzett vizsgálatokból elfogadható pozitív kontrolleredmények állnak rendelkezésre, egyidejűleg alkalmazott kontrollok helyett ezek is használhatók.

Adagolási szintek (dózisok)

Egy adagolási szintet vizsgálnak, rendszerint azt a legnagyobb dózist, amely minimális toxikus hatást fejt ki, de még nem befolyásolja a szaporodási viselkedést vagy a túlélést. A dózis-hatás összefüggés megállapításához még legalább két alacsonyabb adaggal kezelt csoportra is szükség van. Nem mérgező anyagoknál a legnagyobb megengedhető adagot használják.

A kísérlet végrehajtása

Kezelés és pároztatás

Kétféle kezelési protokoll áll rendelkezésre. A leggyakrabban alkalmazott a vizsgált anyag egyszeri adagolása. Másik lehetőség a vizsgált anyag adagolása heti hét napon át, 35 napon keresztül. A kezelések utáni pároztatások számát a kezelési protokoll határozza meg, amelynek biztosítania kell, hogy a csírasejtképződés minden kezelt fázisából legyen mintavétel. A párzási időszak végén a nőstényeket egyedileg ketrecbe kell zárni. Elléskor feljegyzik a napot, az alomszámot és az utódok nemét. Valamennyi hím utódot elválasztják, és a nőstény utódokkal nem foglalkoznak, hacsak nem akarják felhasználni azokat is a vizsgálatban.

A transzlokáció-heterozigócia vizsgálata

Az alábbi két módszer egyike használható:

— az F1 utódok termékenységének vizsgálata és a lehetséges transzlokációk utólagos igazolása citogenetikai elemzéssel,

— valamennyi hím F1 utód citogenetikai vizsgálata termékenységvizsgálattal végzett előzetes kiválogatás nélkül.

a) Termékenységvizsgálat

Az F1 utód csökkent termékenységét az alomszám megfigyelésével és/vagy az ezen állattal pároztatott nőstények méhtartalmának vizsgálatával mutathatják ki.

A normális, illetve csökkent termékenység kritériumait a felhasznált egértörzs sajátságainak megfelelően kell meghatározni.

▼B

Alomszám-megfigyelések: A vizsgálandó F_1 hímeket ugyanazon vizsgálatból vagy ugyanazon tenyészetből származó nőstényekkel együtt ketrecekbe zárják. A ketreceket a párzás utáni 18. naptól kezdődően naponta megvizsgálják. Az alom létszámát és az F_2 utódok nemét elléskor feljegyzik, az almot ezután eltávolítják. Ha F_1 nőstény utódokat vizsgálnak, a kis almok F_2 utódait további vizsgálatok céljaira megtartják. A nőstény transzlokációhordozókat bármely hím utódjuk transzlokációs citogenetikai vizsgálatával azonosíthatják. Az XO-nőstényeket az utódok ivari megoszlásának változásából ismerhetik fel, a hímek és nőstények aránya 1:1-ről l:2-re változik. A normál F_1 állatokat egy több egymást követő lépésből álló eljárásban kivonják a vizsgálatból, ha az első F_2 alom létszáma eléri vagy meghaladja az előre meghatározott normál értéket, ellenkező esetben viszont a második vagy harmadik F_2 almot is megfigyelik.

Azon F_1 állatokat, amelyeket még a harmadik F_2 alom után sem lehet normálisnak tekinteni, vagy tovább vizsgálják a velük pároztatott nőstények méhtartalmának elemzésével, vagy rögtön citogenetikai vizsgálatnak vetik alá.

A méhtartalom elemzése: A transzlokáció-hordozók alomlétszámának csökkenése az embrionális elhalálozásnak tudható be, ezért nagyszámú elhalt implantátum jelzi a vizsgált állatban kialakult transzlokációt. A vizsgálandó F_1 hímeket két-három nősténnyel pároztatjuk. A fogamzás napját a hüvelyi dugó reggelente történő, napi vizsgálatával állapítják meg. A nőstényeket 14–16 nappal később elpusztítják, és méhükben meghatározzák és feljegyzik az élő, illetve elhalt embriók számát.

b) Citogenetikai elemzés

Levegőn végzett szárítás módszerével herepreparátumokat állítunk elő. A transzlokációhordozókat a primer spermatociták I. típusú diakinézis-metafázisban megjelenő polivalens konfigurációi alapján azonosítjuk. Legalább két sejtet kell találni polivalens asszociációval ahhoz, hogy kijelenthessük, a vizsgált állat transzlokáció-hordozó.

Ha nem végeztünk tenyésztési szelekciót, minden F_1 hímet egyenként kell citogenetikailag megvizsgálni. Hímenként legkevesebb 25 I. típusú diakinézis-metafázisban levő sejtet kell mikroszkóposan megvizsgálni. A kis herékkel, illetve a diakinézis előtti meiotikus károsodással rendelkező F_1 hímeknél, valamint azon F_1 nőstényeknél, amelyeknél felmerül az XO-károsodás gyanúja, el kell végezni a spermatogoniumsejtek vagy a csontvelői sejtek mitotikus metafázisainak vizsgálatát is. Egy szokatlanul hosszú és/vagy rövid kromoszóma jelenléte mind a tíz sejtben egy bizonyos, hímsterilitást okozó transzlokációra utal (c-t típus). Egyes X-autoszóma-transzlokációkat, amelyek szintén hímsterilitást okoznak, csak a mitotikus kromoszómák sávos elemzésével lehet kimutatni. Ha mind a 10 mitózisban 39 kromoszómát találunk, az a nőstény XO-kromoszóma eltérését bizonyítja.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni.

Minden párzási időszakra megadják a szülői párosításból származó átlagos alomszámot és a nemek arányát születéskor és a szoptatástól való elválasztáskor.

▼B

Az F_1 állatok termékenységvizsgálatát, a normálpárok átlagos alomszámát és az F_1 transzlokáció-hordozók egyedenkénti alomszámát is bemutatják. A méhtartalom-elemzésnél a normálpárok élő és elhalt implantátumainak átlagos számát viszonyítják az F_1 transzlokáció-hordozók párosításából származó élő és elhalt implantátumok egyedenkénti számához.

Az I. típusú diakinézis-metafázis citogenetikai elemezésekor a különféle típusú polivalens konfigurációk számát és a teljes sejtszámot sorolják fel minden transzlokáció-hordozó esetében.

A steril F_1 egyedeknél a teljes párzási számot és a párosodási időszak hosszát jegyzik fel. Megadják a herék súlyának és a citogenetikai elemzés eredményének adatait.

Az XO-nőstények esetében az átlagos alomszámot, az F_2 nemzedék ivararányát és a citogenetikai elemzés eredményeit kell megadni.

Ha az F_1 transzlokáció-hordozókat termékenységvizsgálattal előszelektáljuk; ilyenkor a táblázatoknak azt is be kell mutatniuk, hogy ezek közül hány állat bizonyult heterozigótának a transzlokáció szempontjából.

A negatív és a pozitív kontrollvizsgálatok adatait egyaránt jegyzőkönyvezni kell.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— az egértörzs neve, az állatok kora, a kezelt állatok testsúlya,

— a szülő állatok száma nemenként a vizsgálati és a kontrollcsoportokban,

— a vizsgálati feltételek, a kezelés részletes leírása, dózisok, oldószerek, a párzási ütemterv,

— az utódok száma és neme nőstényenként, a transzlokáció-elemzésre szánt utódok száma és neme,

— a transzlokáció-elemzés időpontja és kritériumai,

— a transzlokáció-hordozók száma és részletes ismertetése, beleértve a tenyésztési adatokat és a méhtartalom adatait is, ha alkalmazhatók,

— a citogenetikai eljárások és a mikroszkópos elemzés részletei, lehetőség szerint képekkel,

— az eredmények statisztikai feldolgozása,

— az eredmények megvitatása,

— az eredmények értelmezése.

▼B

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

▼B

B.26. SZUBKRÓNIKUS ORÁLIS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT, RÁGCSÁLÓKON VÉGZETT 90 NAPOS, ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ ORÁLISTOXICITÁS-VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

E szubkrónikusorálistoxicitás-vizsgálat megfelel az OECD TG 408-nak (1998).

1.1. BEVEZETÉS

Egy vegyi anyag toxikus jellemzőinek értékelése és felmérése során az ismételt adagolású szubkrónikus orális toxicitást azután lehet meghatározni, hogy az akut vagy a 28 napos ismételt adagolású toxicitásvizsgálatok kezdeti eredményei már rendelkezésre állnak. A 90 napos vizsgálat a szoptatási időszak befejeztétől a felnőttkorba váltás periódusát is átfogó időszakban a hosszabb ideig tartó, ismételt expozícióból adódó lehetséges egészségkárosodásra vonatkozó információkat tárja fel. A vizsgálat tájékoztat a fontosabb toxikus hatásokról, jelzi a célszerveket és a felhalmozódás lehetőségét, és becslést ad az expozíció kimutatható káros hatással nem járó szintjére (NOAEL) nézve, amit fel lehet használni a krónikustoxicitás-vizsgálatok dózisszintjeinek kiválasztásához és az emberi expozíció biztonsági kritériumainak megállapításához.

A módszer nagy hangsúlyt fektet a neurológiai végpontokra, és jelzi az immunrendszerre és a szaporodásra gyakorolt hatásokat. Szintén hangsúlyt kap a kísérleti állatok gondos klinikai megfigyelésének szükségessége is a lehető legtöbb információ megszerzése érdekében. E vizsgálat lehetővé teszi azon vegyi anyagok körének megállapítását, amelyek potenciálisan neurotoxikus hatásokkal járnak, vagy kedvezőtlen hatásokat gyakorolnak az immunrendszerre vagy a szaporítószervekre, és ennélfogva további, mélyreható kutatások és vizsgálatok elvégzését indokolják.

Lásd még az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Dózis: a vizsgált anyag beadott mennyisége. A dózis mennyiségét tömegben (gramm vagy milligramm) vagy a vizsgált anyag és a vizsgált állat tömegének hányadosában (pl. milligramm anyag/testtömeg kilogramm), vagy állandó táplálékbeli koncentráció formájában (ppm vagy milligramm/táplálék-kilogramm) fejezik ki.

Adagolás: általános meghatározás, ami a dózist, az adagolás gyakoriságát és időtartamát tartalmazza.

NOAEL: a „kimutatható káros hatással nem járó dózisszint” (no observed adverse effect level) rövidítése, és azon legmagasabb adagolási szintet jelöli, amelynél még nem észlelhető a kezeléssel összefüggésben lévő kedvezőtlen hatás.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot naponta, szájon át adják be több kísérleti állatcsoportnak, csoportonként más-más adagolási szinten, 90 napon keresztül. A szer beadásának időszakában az állatokat a toxicitás jeleinek észlelése érdekében gondosan megfigyelik. Az elpusztult, illetve az elpusztított állatokat felboncolják, illetőleg a vizsgálat befejezése után a túlélő állatokat is elpusztítják és felboncolják.

▼B

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Az állatok előkészítése**

A laboratóriumi körülményekhez legalább öt napon keresztül hozzászoktatott és korábbi kísérleti eljárásoknak még alá nem vetett, egészséges állatokat használnak. A kísérleti állatokat faj, törzs, eredet, nem, súly és/vagy életkor szerint leírják. Az állatokat véletlenszerűen kezelt és kontrollcsoportokba osztják be. A ketreceiket olyan módon helyezik el, hogy az elhelyezésükből adódó lehetséges hatásokat a minimumra lehessen csökkenteni. Minden állatot számmal jelölnek meg az egyedi azonosíthatóság céljából.

1.4.2. **A dózisok előkészítése**

A vizsgált anyagot gyomorszondán át, az állatok táplálékába vagy az ivóvízbe keverve adják be. A szájon át történő beadás módszerét a vizsgálat céljától, valamint a vizsgált anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól függően választják meg.

Szükség esetén a vizsgált anyagot feloldják vagy szuszpendálják alkalmas vivőanyagban. Amennyiben lehetséges, úgy elsősorban a vizes oldat/szuszpenzió használata javasolt, másodsorban az olajos (pl. kukoricaolaj) oldat/szuszpenzió alkalmazása jöhet számításba, és ezt követheti a másfajta vivőanyagokban történő feloldás. Amennyiben nem víz a vivőanyag, akkor a vivőanyag toxikus tulajdonságainak ismertnek kell lenniük. Meghatározzák a vizsgált anyag stabilitását a beadás körülményei között.

1.4.3. **Vizsgálati körülmények**

1.4.3.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

A javasolt faj a patkány, de a rágcsálók más fajai (pl. egerek) is felhasználhatók. Kísérleti célokra általánosan használt, laboratóriumi törzsekből származó fiatal, egészséges, felnőtt állatokat használnak. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek (nulliparák) vagy vemhesek. Az adagolást az elválasztás után a lehető legrövidebb időn belül célszerű elkezdeni, de mindenképpen az állatok kilenchetes kora előtt. A vizsgálat kezdetén az állatok testtömege csak minimálisan térhet el egymástól, és a nemenkénti átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözhet. Ha a vizsgálatot egy hosszú távú krónikustoxicitás-vizsgálat előkísérleteként végzik el, akkor mindkét kísérlethez ugyanabból a törzsből való, azonos eredetű állatokat használnak.

1.4.3.2. *Az állatok száma és neme*

Minden egyes dózisszinthez legalább 20 állatot (10 hímet és 10 nőstényt) alkalmaznak. Ha időközi elpusztítást terveznek, akkor a csoport létszámát a kísérlet során elpusztítani szándékozott állatok számával megnövelik. A vegyi anyagra vagy annak egy közeli analógiájára vonatkozó korábbi ismeretekre alapozva fontolóra lehet venni egy további, 10 állatból (5 hím és 5 nőstény) álló ún. kísérőcsoport használatát a kontrollcsoportban és a legnagyobb adaggal kezelt csoportban, hogy a kezelés időszakát követően meg lehessen figyelni a toxikus hatás reverzibilitását vagy tartósságát. Az ilyen, kezelés utáni időszak hosszát a megfigyelt hatások figyelembevételével határozzák meg.

▼B

1.4.3.3. *Dózisszintek*

Legalább három dózisszintet és egy párhuzamos kontrollszintet alkalmaznak, kivéve, ha határérték-vizsgálatra kerül sor (lásd az 1.4.3.4. pontot). A dózisszintet ismételt dózis- vagy dózisbehatároló vizsgálatok eredményeire lehet alapozni, figyelembe véve minden korábbi, a vizsgált vagy azzal rokon anyagokra vonatkozó, rendelkezésre álló toxikológiai és toxikokinetikai adatot. Ha a vizsgált anyag fizikai-kémiai tulajdonságai vagy biológiai hatásai nem szabnak korlátokat, akkor a legmagasabb adagolási szintet úgy választják ki, hogy az az állat halála vagy súlyos szenvedése nélkül idézze elő a toxicitást. Ezután az adagokat fokozatosan csökkentik, azzal a céllal, hogy bemutassák a dózisszinttől függő hatásokat és a kimutatható káros hatással nem járó dózisszintet (NOAEL). A csökkenő dózisok beállításához gyakran kétszeres-négyszeres hosszúságú időszakok bizonyulnak optimálisnak, és sokszor tanácsos egy negyedik kezelt csoport alkalmazása, igen nagy dózisbeli különbség (pl. több mint 6–10-szeres) alkalmazásával.

A kontrollcsoport vagy kezeletlen állatokból áll, vagy a vivőanyag ellenőrzésére szolgál, ha a vizsgált anyag adagolásának elősegítésére vivőanyagot használnak. A vizsgált anyaggal való kezeléstől eltekintve a kontrollcsoportban lévő állatokat a kezelt csoportba beosztottakkal azonos bánásmódban részesítik. Ha vivőanyagot használnak a vizsgált anyag beadásához, akkor a kontrollcsoport a vivőanyagot a legnagyobb alkalmazott mennyiségben kapja. Ha a vizsgált anyagot a táplálékkal viszik be, és emiatt az állatok kevesebb táplálékot vesznek magukhoz, akkor egy párhuzamosan táplált kontrollcsoport használata hasznos lehet annak megállapításához, hogy a csökkent étvágy a táplálék ízletességével vagy a vizsgálati modellben beállt toxikológiai változásokkal áll-e összefüggésben.

Figyelembe veszik a vivőanyag és – esettől függően – más adalékanyagok alábbi jellemzőit: a felszívódásra, eloszlásra vagy anyagcserére gyakorolt hatás, a vizsgált anyagnak a szervezetben való visszatartására, ill. a vizsgált anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt hatás, amely módosíthatja a toxikus jellemzőket; és az állatok táplálék- és vízfelvételére vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatás.

1.4.3.4. *Határérték-vizsgálat*

Ha a kísérlet során a legalább 1 000 mg/testtömeg kg/nap dózisszint, ill. a táplálékban vagy ivóvízben beadott anyagmennyiség megfelelő koncentrációja (a testtömeg alapján végzett számítások szerint) és az e vizsgálat lefolytatására előírt eljárás betartása mellett a vizsgált anyag nem okoz észlelhető toxikus hatásokat, és ha a szerkezet tekintetében rokon anyagokra vonatkozó adatok alapján nem is várható a toxicitás bekövetkezése, akkor a teljes, három adagolási szintet átfogó tanulmány elvégzése szükségtelennek tekinthető. A határértékvizsgálat alkalmazható, kivéve, ha emberi expozíció ennél nagyobb adagolási szint használatát indokolja.

1.5. A KÍSÉRLET VÉGREHAJTÁSA

1.5.1. **A dózisok beadása**

A kísérleti állatoknak a vizsgált anyagot 90 napon keresztül heti hét napon át, naponta adagolják. Bármely más adagolási rendszer – pl. heti öt nap – célszerűségét indokolni kell. Ha a vizsgált anyagot gyomorszondán át adják be, akkor ennek vagy egy megfelelő intubációs kanülnek a segítségével egyetlen adagban juttatják be a szert. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. E mennyiség nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömeget, kivéve a vizes oldatok esetében, amikor 2 ml/100g testtömeg adható. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy maró anyagok kivételével a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi adagolási szinten konstans mennyiséget lehessen adagolni a kísérleti állatoknak.

▼B

A táplálékkal vagy ivóvízzel adagolt anyagok esetében fontos biztosítani, hogy a vizsgált anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt és a vízháztartás egyensúlyát. Ha a vizsgált anyagot a táplálékkal együtt adják be, akkor vagy állandó koncentrációban (ppm) keverik be, vagy az állat testsúlyától függő, állandó nagyságú dózisban adagolják. A kiválasztott módszert megjelölik. Gyomorszondán át történő adagolás esetén a dózist minden nap azonos időpontban adják be, mennyiségét a kísérleti állat testtömegéhez igazítják, és azonos mennyiséget adnak be minden alkalommal. Ha a 90 napos vizsgálatot egy hosszan tartó krónikustoxicitás-vizsgálat előkísérleteként végzik, akkor a két kísérletben azonos étrendet alkalmaznak.

1.5.2. **Megfigyelések**

A megfigyelési időszak legalább 90 nap. A kísérőcsoportban lévő állatokat, amelyekkel további megfigyeléseket terveznek, megfelelő hosszúságú időszakra kezelés nélkül tartják, hogy a toxikus hatások késleltetett előfordulását vagy megmaradását, vagy visszafordíthatóságát megfigyeljék.

Általános klinikai megfigyelést végeznek naponta legalább egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban, figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Feljegyezik a kísérleti állatok klinikai kórállapotát. Naponta legalább kétszer, rendszerint a nap elején és végén megvizsgálják az összes állatot, hogy nem mutatják-e a morbiditás és mortalitás jeleit.

A vizsgált anyag hatásának való első expozíció előtt legalább egyszer (az egyedek közötti összehasonlítás érdekében), azt követően hetente egyszer az összes állatot részletes klinikai vizsgálatoknak vetik alá. E megfigyeléseket azon ketreceken kívül, ahol egyébként tartják őket, lehetőleg egy szabványos karámban, minden alkalommal a nap hasonló időszakában végzik el. A megfigyeléseket gondosan feljegyzik, lehetőleg a vizsgálatot végző laboratórium által meghatározott pontozásos rendszer segítségével. Törekedni kell arra, hogy a megfigyelési feltételek változatlanok legyenek. A feljegyzett észleléseknek ki kell terjedniük, de nem korlátozandók a következőkre: a bőr, a bunda, a szemek és a nyálkahártyák állapotának, a vizelet- és ürülékkiválasztás és az autonóm mozgások (pl. könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupilla mérete, szokatlan légzési ritmusok) változásaira. A testtartás, a járás bizonytalansága, a kézbevételre bekövetkezett változások, valamint a tónusos vagy klónusos görcsök, sztereotip viselkedés (pl. túlzott mosdás, megkergülés) vagy bármilyen bizarr viselkedésmód (pl. öncsonkítás, hátrafelé járás) megfigyelt eseteit is feljegyezik (1).

A vizsgált anyag beadását szemtükörrel vagy más, egyenértékű eszközzel végzett szemészeti vizsgálat előzi meg, amelyet a vizsgálatsorozat végén megismételnek, lehetőleg az összes állaton, de legalább a nagy dózist kapott egyedeken és a kontrollcsoport tagjain. Ha a szemben elváltozást tapasztalnak, az összes állatot megvizsgálják.

Az expozíciós időszak vége felé és a 11. hétnél semmiképpen sem korábban elvégezik a különböző típusú (1) ingerekre (hallószervi, vizuális, önérzékelési ingerek) mutatott reakciók vizsgálatát (2), (3), (4), a fogás/szorítás erejének becslését (5) és a motoros aktivitás felmérését (6). A követendő eljárások további részletei a megfelelő szakirodalomban találhatók. Ettől függetlenül a hivatkozottaktól eltérő alternatív eljárásokat is lehet alkalmazni.

A vizsgálatsorozat végén lefolytatott funkcionális megfigyelésektől el lehet tekinteni, ha ilyen jellegű adatok más vizsgálatok alapján rendelkezésre állnak, és a napi klinikai megfigyelések nem tártak fel funkcionális hiányosságokat.

▼B

Kivételesen a funkcionális megfigyelésektől azon csoportok esetében is el lehet tekinteni, amelyek egyébként olyan mértékű toxicitás jeleit produkálják, ami már jelentős mértékben megzavarná a funkcionális vizsgálat eredményeit.

1.5.2.1. *Testtömeg és táplálék-/vízfogyasztás*

Minden állatot hetente legalább egyszer lemérnek. A felvett táplálék mennyiségét hetente legalább egyszer lemérik. Ha a vizsgált anyagot az ivóvízbe keverik, akkor a vízfogyasztást is legalább hetente lemérik. A vízfogyasztás a táplálékkal és a gyomorszondával történő bejuttatásra alapozott vizsgálatoknál is figyelembe vehető tényező, mivel ezek során az ivási szokások megváltozhatnak.

1.5.2.2. *Hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatok*

Vérmintákat vesznek egy megnevezett helyről és – amennyiben lehetséges – ezeket megfelelő körülmények között tárolják. A vizsgálati időszak végén az állatok elpusztítása előtt vagy annak részeként vérmintát vesznek.

A vizsgálati időszak végén és az esetleges időközi vérmintavétel alkalmával a következő hematológiai vizsgálatokat végzik el: hematokrit, hemoglobin koncentráció, vörösvértestszám, leukocitaszám (teljes és differenciált vérkép), trombocitaszám és a véralvadási idő/képesség mérése.

A szövetekben jelentkező fontosabb toxikus hatások és különösen a vesékre és a májra gyakorolt hatás vizsgálata érdekében a klinikai biokémiai értékek meghatározását közvetlenül az állatok elpusztítása előtt vagy annak részeként elvégzett vérvétel során szerzett mintán végzik el (eltekintve a haldokló és/vagy időközben leölt egyedektől). A hematológiai vizsgálatokhoz hasonló módon időközbeni mintavételt lehet végezni klinikai biokémiai vizsgálatok céljaira. A vérvétel előtti éjszaka ajánlatos az állatokat koplaltatni ([1]). A vérplazma-és vérszérummeghatározások során vizsgálandó elemek: nátrium, kálium, vércukor, összkoleszterin, karbamid, vér karbamid-nitrogén szintje, kreatinin, összprotein és albumin, továbbá több mint két, májkárosodást jelző enzim (pl. alanin-aminotranszferáz, aszpartát-aminotranszferáz, alkalikus foszfatáz, gamma-glutamil-transzpeptidáz és szorbit-dehidrogenáz). További enzimek vizsgálatát (májjal vagy más szervekkel kapcsolatosakat), és az epesavak mérését, amelyek bizonyos körülmények között hasznos információkkal szolgálhatnak, szintén be lehet vonni a vizsgálatok körébe.

Kiegészítésként, a vizsgálatok utolsó hetében, amikor a vizeletet előre meghatározott időpontokban gyűjtik, az alábbi vizeletminta-vizsgálatokat lehet elvégezni: megjelenés, mennyiség, ozmolalitás vagy fajsúly, pH-érték, fehérjék, glukóz és vér/vérsejtek.

Ezeken túlmenően megfontolható az általános szöveti roncsolódás szérummarkereinek vizsgálata. Más vizsgálatokat is elvégeznek, ha a vizsgált anyagnak ismert vagy feltételezhető hatása van a kapcsolódó anyagcsere-folyamatokra; ilyen pl. a kalcium, a foszfát, éhgyomorra mért triglicerid, specifikus hormonok, a methemoglobin és a kolinészteráz mérése. Ezeket az értékeket az egyes besorolási osztályokhoz tartozó vegyi anyagokra nézve vagy eseti alapon célszerű meghatározni.

([1]) A szérum- és a plazmavizsgálatok, de főleg a glükóz meghatározása miatt ajánlatos a vizsgálat előtti éjszaka koplaltatni az állatokat. Ennek fő indoka az, hogy ha a vizsgálatokat megelőző koplaltatás nélkül végzik, akkor a kapott eredmények meglehetősen változatosak lennének, ami így a kevésbé jellegzetes hatások felismerését és értelmezését megnehezítené. Más oldalról megközelítve a kérdést, azt is el kell ismerni, hogy a koplaltatás befolyásolja a kísérleti állatok (rendes) anyagcseréjét, különösen azon tanulmányok esetében, ahol a vizsgált anyagot a táplálékkal adagolják, és így következik be az expozíció. Ha mégis az éjszakai koplaltatás mellett döntenek, akkor a tanulmány negyedik hetében, a funkcionális megfigyeléseket követően meg kell határozni a klinikai biokémiai paramétereket.

▼B

Rugalmas hozzáállásra van szükség, amely vizsgált fajtól és az adott vizsgált anyag megfigyelt és/vagy várható hatásaitól egyaránt függ.

Ha a rendelkezésre álló kiinduló adatok nem bizonyulnak elegendőnek, akkor megfontolandó a hematológiai és klinikai biokémiai változók meghatározása az adagolás kezdete előtt. Általában nem javasolt az ilyen adatok meghatározása a kezelés megkezdése előtt (7).

1.5.2.3. *Autopszia*

A vizsgálatokba bevont összes állatot teljes körű, beható autopsziának vetik alá, ideértve a következők alapos vizsgálatát: a test külső felszíne, az összes testnyílás, a koponya, a mellüreg, a hasüreg és ezek szervei. Az összes állat máját, veséit, mellékveséit, heréit és mellékheréit, méhét, petefészkeit, csecsemőmirigyét, lépét, agyát és szívét (eltekintve a haldokló és/vagy időközben leölt egyedektől) megtisztítják minden rátapadt szövettől, és a boncolást követően a lehető legrövidebb időn belül megmérik a kiszáradás megelőzése érdekében.

Az alábbi testszöveteket mind a szövetek típusának megállapítása, mind pedig a szándékolt későbbi kórszövettani vizsgálatok szempontjából célszerű fixálni: minden szövetet, amin van makroszkópikus változás, az agyat (a reprezentatív részek között a nagyagyat, kisagyat és a nyúltagyat/nyúltagyi hidat), a gerincvelőt (három szinten: nyaki, mellkasi középső szakasz és ágyéktájék), a hipofízist, a pajzsmirigyet és mellékpajzsmirigyet, a csecsemőmirigyet, a nyelőcsövet, a nyálmirigyeket, a gyomrot, a vékony- és vastagbelet (beleértve a Peyer-plakkot), a májat, a hasnyálmirigyet, a veséket, a mellékveséket, a lépet, szívet, a légcsövet és a tüdőket (ezeket felfújt állapotban kell rögzíteni és fixálni), az aortát, ivarmirigyeket, a méhet, a járulékos ivarszerveket, a nőstények emlőmirigyeit, a prosztatát, a húgyhólyagot, az epehólyagot (egérnél), a nyirokcsomókat (egyet lehetőleg a vizsgált anyag beadási útvonalába eső, egyet pedig egy attól távoli helyről véve, a keringési rendszerre gyakorolt hatások megállapításához), a perifériás idegeket (csípő vagy sípcsont környéki), lehetőleg az izomzathoz közeli helyről véve, egy metszetet a csontvelőből (és/vagy egy, friss csontvelőből felszívott mintát), a bőrt és a szemeket (ha a szemészeti vizsgálatok elváltozásokat jeleztek). A klinikai és más jellegű megfigyelések alapján további testszövetek vizsgálata is szükségesnek tűnhet. A fentieken túl megőriznek minden olyan más szervet is, amelyek a vizsgált anyag ismert tulajdonságai alapján valószínűleg célszerveknek tekinthetők.

1.5.2.4. *Kórszövettani vizsgálatok*

A tartósított szerveket és szöveteket mind a kontrollcsoport, mind a magas dózissal kezelt csoport összes egyede esetében teljes kórszövettani vizsgálatnak vetik alá. Ha a magas dózissal kezelt csoport egyedei esetében a kezelésnek tulajdonítható elváltozások figyelhetők meg, e vizsgálatot az összes többi, különböző dózissal kezelt csoport egyedeire is kiterjesztik.

Minden makroszkopikus eltávozást megvizsgálnak.

Ún. kiegészítő csoport használata esetén az egyedek azon szerveit és szöveteit vizsgálják meg, amelyeknél a kezelt csoportok egyedei esetében elváltozásokat lehetett kimutatni.

▼B

2. **ADATOK ÉS JELENTÉSKÉSZÍTÉS**

2.1. ADATOK

Minden egyes állattal kapcsolatban rögzítik az adatokat. Ezenfelül az összes adatot táblázat formájában összegzik, a vizsgált állatok minden csoportja tekintetében bemutatva, hogy hány egyeddel indult a vizsgálat, hány állat pusztult el, illetve hányat kellett elpusztítani humánus okokból a kísérlet során, valamint az elpusztulás és az elpusztítás időpontját; hány egyed mutatta toxicitás jeleit, a megfigyelt toxicitás jeleinek leírását, ideértve bármely toxikus hatás kezdetének idejét, időtartamát és súlyosságát, az elváltozásokat mutató állatok számát, az elváltozások típusát és az egyes elváltozástípusokat mutató állatok százalékos arányát.

Amennyiben lehetséges, a nyers adatokat megfelelő, általánosan elfogadott statisztikai módszerrel értékelik ki. A statisztikai módszert már a vizsgálat tervezésének idején kiválasztják.

2.2. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés – amennyiben lehetséges – tartalmazza a következő információkat:

2.2.1. **A vizsgált anyag**

— fizikai megjelenése, tisztasága és fizikai-kémiai tulajdonságai,

— azonosító adatok,

— vivőanyag (ha van): a vivőanyag – ha az nem víz – kiválasztásának indoklása.

2.2.2. **A vizsgált fajok**

— a felhasznált állatok faja és törzse,

— az állatok száma, életkora és neme,

— az állatok eredete, tartási körülmények, étrend stb.,

— az egyes állatok testtömege a vizsgálatok kezdetekor.

2.2.3. **Vizsgálati körülmények**

— a dózisszintek megválasztásának indokai,

— a vizsgált anyag formulálásának/étrendbe való beillesztésére vonatkozó részletek, a készítmény koncentrációja, stabilitása és homogenitása,

— a vizsgált anyag adagolásának részletei,

— átszámítás a vizsgált anyagnak a táplálékban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/testtömeg kg/nap), ha ez alkalmazható,

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó adatok.

2.2.4. **Eredmények**

— az egyedek testsúlya és annak változásai,

— táplálék-/vízfogyasztásra vonatkozó adatok,

— toxikus reakcióra vonatkozó adatok, nemek és adagolási szint szerinti csoportosításban, beleértve a toxicitás jeleit,

▼B

— a megfigyelt klinikai tünetek természete, súlyossága és tartama (reverzibilisek vagy nem);

— a szemészeti vizsgálatok eredményei,

— érzékszervek működése, szorítás erőssége, motoros aktivitás értékelése (ahol ilyen adatok rendelkezésre állnak),

— hematológiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel,

— a klinikai biokémiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel,

— a végső testtömeg, szervtömegek és a szervtömeg/testtömeg hányadosok,

— boncolási leletek,

— az összes kórszövettani lelet részletes leírása,

— abszorpciós adatok, ha ilyenek rendelkezésre állnak,

— az eredmények statisztikai feldolgozása, amennyiben lehetséges.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

3. **SZAKIRODALOM**

(1) IPCS (1986). PRinciples and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

(2) Tupper, D. E., Wallace, R. B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, pp. 999-1003.

(3) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, pp. 691-704.

(4) Moser, V. C, Mc Daniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, pp. 267-283.

(5) Meyer O. A., Tilson H. A., Byrd W. C, Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, pp. 233-236.

(6) Crofton K. M., Howard J. L., Moser V. C, Gill M. W., Reiter L. W., Tilson H. A., MacPhail R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, pp. 599-609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996). „Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies”, Fundam. & Appl. Toxicol., 29, pp. 198- 201.

▼B

B.27. SZUBKRÓNIKUS ORÁLIS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT, 90 NAPOS, ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ ORÁLIS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT NEM RÁGCSÁLÓKON

1. MÓDSZER

E szubkrónikusorálistoxicitás-vizsgálat megfelel az OECD TG 409-nek (1998).

1.1. BEVEZETÉS

Egy vegyi anyag toxikus jellemzőinek értékelése és felmérése során az ismételt adagolású szubkrónikus orális toxicitást azután lehet meghatározni, hogy az akut vagy 28 napos ismételt adagolású toxicitásvizsgálatok kezdeti eredményei már rendelkezésre állnak. A 90 napos vizsgálat olyan hosszabb időtartamú ismételt expozícióból származó lehetséges egészségkárosodás veszélyeiről szolgáltat információkat, ami időben átfogja a fiatal felnőttkorig terjedő gyors növekedés szakaszát. A vizsgálat tájékoztat a fontosabb toxikus hatásokról, jelzi a célszerveket és a felhalmozódás lehetőségét, és becslést ad az expozíció kimutatható káros hatással nem járó szintjére (NOAEL) nézve, amit fel lehet használni a krónikustoxicitás-vizsgálatok során az adagolási szintjeinek kiválasztásához és az emberi expozíció biztonsági kritériumainak megállapításához.

A vizsgálati módszer, amely lehetővé teszi a vegyi anyagoknak való kitettség kedvezőtlen hatásainak meghatározását nem rágcsálókon, csak az alábbi esetekben használandó:

— ha más vizsgálatok megállapításai jelzik annak szükségességét, hogy egy második, nem rágcsáló fajon végzett kísérlettel kell tisztázni/leírni az eredményeket,

— ha a toxikokinetikai vizsgálatok arra utalnak, hogy a laboratóriumi kísérletek céljaira egy specifikus nem rágcsáló típusú faj lenne a legmegfelelőbb kísérleti állat,

— ha más, különleges okok indokolják egy nem rágcsáló faj használatát.

Lásd még az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Dózis: a vizsgált anyag beadott mennyisége. A dózis mennyiségét tömegben (gramm vagy milligramm) vagy a vizsgált anyag és a vizsgált állat tömegének hányadosában (pl. milligramm anyag/testtömeg kilogramm), vagy állandó táplálékbeli koncentráció formájában (ppm vagy milligramm/táplálék-kilogramm) fejezik ki.

Adagolás: általános meghatározás, ami a dózist, az adagolás gyakoriságát és időtartamát tartalmazza.

NOAEL: a „kimutatható káros hatással nem járó dózisszint” (no observed adverse effect level) rövidítése, azon legmagasabb dózisszintet jelöli, amelynél nem észlelhető a kezeléssel összefüggő kedvezőtlen hatás.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot naponta szájon át adják be több kísérleti állatcsoportnak, csoportonként más-más adagolási szinten, 90 napon keresztül. A szer beadása időszakában az állatokat a toxicitás jeleinek észlelése érdekében gondosan megfigyelik. Az elpusztult, illetve az elpusztított állatokat felboncolják, illetőleg a vizsgálat befejezése után a túlélő állatokat is elpusztítják és felboncolják.

▼B

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **A faj kiválasztása**

A nem rágcsáló fajok közül a leggyakrabban használt a kutya, annak is egy meghatározott fajtája; ez rendszerint a beagle kutya. Más állatfajok is használhatók, pl. a sertés vagy a törpemalac. Főemlősök használata nem javasolt, külön indoklást igényel. Fiatal, egészséges állatokat használnak; a kutya esetében a vizsgált anyag adagolását 4–6 hónapos életkorban, de kilenc hónapos kornál nem később célszerű megkezdeni. Ha a vizsgálatot egy hosszú távú krónikustoxicitás-vizsgálat előkísérleteként végzik el, akkor mindkét kísérlethez ugyanazon törzsből való, azonos eredetű állatokat használnak.

1.4.2. **Az állatok előkészítése**

A laboratóriumi körülményekhez hozzászoktatott és korábbi kísérleti eljárásoknak még alá nem vetett, egészséges, fiatal állatokat használnak fel. Az akklimatizáció időtartama a kísérlethez kiválasztott fajtól és az állatok eredetétől függ. Kutyák és a helyben, e célra tenyésztett sertések esetében legalább öt nap, míg a külső forrásból beszerzett állatoknál legalább két hét szoktatási időtartam ajánlott. A kísérleti állatokat faj, törzs, eredet, nem, testtömeg és/vagy életkor szerint leírják. Az állatokat véletlenszerűen kezelt és kontrollcsoportokba osztják be. A ketreceiket olyan módon helyezik el, hogy az elhelyezésükből adódó lehetséges hatásokat a minimumra lehessen csökkenteni. Minden állatot számmal jelölnek meg az egyedi azonosíthatóság céljából.

1.4.3. **A dózisok előkészítése**

A vizsgált anyagot gyomorszondán át, az állatok táplálékába vagy az ivóvízbe keverve vagy kapszulákban adják be. A szájon át történő beadás módszerét a vizsgálat céljától, valamint a vizsgált anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól függően választják meg.

Szükség esetén a vizsgált anyagot feloldják vagy szuszpendálják alkalmas vivőanyagban, amennyiben lehetséges, elsősorban a vizes oldat/szuszpenzió használata javasolt, másodsorban az olajos oldat/emulzió (pl. kukoricaolaj) alkalmazása jöhet számításba, és ezt követheti a másfajta vivőanyagokban való feloldás. Amennyiben nem víz a vivőanyag, akkor a vivőanyag toxikus tulajdonságainak ismertnek kell lenniük. Meghatározzák a vizsgált anyag stabilitását a beadás körülményei között.

1.5 A KÍSÉRLET VÉGREHAJTÁSA

1.5.1. **Az állatok száma és neme**

Minden dózisszinthez legalább 8 állatot (4 hímet és 4 nőstényt) alkalmaznak. Ha időközi elpusztítást terveznek, akkor a csoport létszámát a kísérlet során elpusztítani szándékozott állatok számával megnövelik. A kísérlet végére életben maradó állatok száma elégséges kell, hogy legyen a toxikus hatások értékeléséhez. A vegyi anyagra vagy annak egy közeli analógiájára vonatkozó korábbi ismeretekre alapozva fontolóra lehet venni egy további, 8 állatból (4 hím és 4 nőstény) álló ún. kísérőcsoport használatát a kontrollcsoportban és a legnagyobb adaggal kezelt csoportban, hogy a kezelés időszakát követően meg lehessen figyelni a toxikus hatás reverzibilitását vagy tartósságát. Az ilyen, kezelés utáni időszak hosszát a megfigyelt hatások figyelembevételével határozzák meg.

▼B

1.5.2. **Adagolási szintek**

Legalább három dózisszintet és egy párhuzamos kontrollszintet alkalmaznak, kivéve, ha határérték-vizsgálatra kerül sor (ld. 1.5.3. pont). A dózisszintet ismételt dózis vagy dózisbehatároló vizsgálatok eredményeire lehet alapozni, figyelembe véve minden korábbi, a vizsgált vagy azzal rokon anyagok toxicitására és a toxiko-kinetikára vonatkozóan rendelkezésre álló adatokat. Ha a vizsgált anyag fizikai-kémiai tulajdonságai vagy biológiai hatásai nem szabnak korlátokat, akkor a legmagasabb adagolási szintet úgy választják ki, hogy az az állat halála vagy komoly szenvedése nélkül idézze elő a toxicitást. Ezután az adagokat fokozatosan csökkentik azzal a céllal, hogy bemutassák a dózisszinttől függő hatásokat és a kimutatható káros hatással nem járó dózisszintet (NOAEL). A csökkenő dózisok beállításához gyakran kétszeres-négyszeres hosszúságú időszakok bizonyulnak optimálisnak, és sokszor tanácsos egy negyedik kezelt csoport alkalmazása, igen nagy dózisbeli különbség (pl. több mint 6–10-szeres) alkalmazásával.

A kontrollcsoport vagy kezeletlen állatokból áll, vagy a vivőanyag ellenőrzésére szolgál, ha a vizsgált anyag adagolásának elősegítésére vivőanyagot használnak. A vizsgált anyaggal való kezeléstől eltekintve a kontrollcsoportban lévő állatokat a kezelt csoportba beosztottakkal azonos bánásmódban részesítik. Ha vivőanyagot használnak a vizsgált anyag beadásához, akkor a kontrollcsoport a vivőanyagot a legnagyobb alkalmazott mennyiségben kapja. Ha a vizsgált anyagot a táplálékkal viszik be, és emiatt az állatok kevesebb táplálékot vesznek magukhoz, akkor egy párhuzamosan táplált kontrollcsoport használata hasznos lehet annak megállapításához, hogy a csökkent étvágy a táplálék ízletességével vagy a vizsgálati modellben beállt toxikológiai változásokkal áll-e összefüggésben.

Figyelembe veszik a vivőanyag és – esettől függően – más adalékanyagok alábbi jellemzőit: a felszívódásra, eloszlásra vagy anyagcserére gyakorolt hatás, a vizsgált anyagnak a szervezetben való visszatartására, ill. a vizsgált anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt hatás, amely módosíthatja a toxikus jellemzőket; és az állatok táplálék- és vízfelvételére vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatás.

1.5.3. **Határérték-vizsgálat**

Ha a kísérlet során a legalább 1 000mg/testtömeg kg/nap dózisszint és az e vizsgálat lefolytatására előírt eljárás betartása mellett a vizsgált anyag nem okoz észlelhető toxikus hatásokat, és ha a szerkezet tekintetében rokon anyagokra vonatkozó adatok alapján nem is várható a toxicitás bekövetkezése, akkor a teljes, három adagolási szintet átfogó vizsgálat elvégzése szükségtelennek tekinthető. A határérték-vizsgálat alkalmazható, kivéve, ha emberi expozíció ennél nagyobb adagolási szint használatát indokolja.

1.5.4. **A dózisok beadása**

A kísérleti állatoknak a vizsgált anyagot 90 napon keresztül heti hét napon át, naponta adagolják. Bármely más adagolási rendszer – pl. heti öt nap – célszerűségét indokolni kell. Ha a vizsgált anyagot gyomorszondán át adják be, akkor ennek vagy egy megfelelő intubációs kanülnek a segítségével egyetlen adagban juttatják be a szert. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. Ennek a mennyiségnek lehetőség szerint alacsonynak kell lennie. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy maró anyagok kivételével, a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi dózisszinten konstans mennyiséget lehessen adagolni a kísérleti állatoknak.

▼B

A táplálékkal vagy ivóvízzel adagolt anyagok esetében fontos biztosítani, hogy a vizsgált anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt és a vízháztartás egyensúlyát. Ha a vizsgált anyagot a táplálékkal együtt adják be, akkor vagy állandó koncentrációban (ppm) keverik be, vagy az állat testsúlyától függő, állandó nagyságú dózisban adagolják. A kiválasztott módszert megjelölik. Gyomorszondán át vagy kapszulával történő adagolás esetén a dózist minden nap azonos időpontban adják be, mennyiségét a kísérleti állat testtömegéhez igazítják, és azonos mennyiséget adnak be minden alkalommal. Ha a 90 napos vizsgálatot egy hosszan tartó krónikustoxicitás-vizsgálat előkísérleteként végzik, akkor a két kísérletben azonos étrendet alkalmaznak.

1.5.5. **Megfigyelések**

A megfigyelési időszak legalább 90 nap. A kísérőcsoportban lévő állatokat, amelyekkel további megfigyeléseket terveznek, megfelelő hosszúságú időszakra kezelés nélkül tartják, hogy a toxikus hatások késleltetett előfordulását vagy megmaradását, vagy visszafordíthatóságát megfigyeljék.

Általános klinikai megfigyelést végeznek naponta legalább egyszer, lehetőleg minden nap ugyazon időpont(ok)ban, figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Feljegyzik a kísérleti állatok klinikai kórállapotát. Naponta legalább kétszer, rendszerint a nap elején és végén megvizsgálják az összes állatot, hogy nem mutatják-e a morbiditás és mortalitás jeleit.

A vizsgált anyag hatásának való első expozíció előtt legalább egyszer (az egyedek közötti összehasonlítás érdekében), azt követően hetente egyszer az összes állatot részletes klinikai vizsgálatoknak vetik alá. E megfigyeléseket azon ketreceken kívül, ahol egyébként tartják őket, lehetőleg egy szabványos karámban, minden alkalommal a nap hasonló időszakában végzik el. A megfigyeléseket gondosan feljegyzik, beleértve jelentkezésük időpontját, méretüket és tartalmukat. A feljegyzett észleléseknek ki kell terjedniük, de nem korlátozandók a következőkre: a bőr, a bunda, a szemek és a nyálkahártyák állapotának, a vizelet- és ürülékkiválasztás és az autonóm mozgások (pl. könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupilla mérete, szokatlan légzési ritmusok) változásaira. A testtartás, a járás bizonytalansága, a kézbevétel, valamint a tónusos vagy klónusos görcsök, sztereotip viselkedés (pl. túlzott mosdás, megkergülés) vagy bármilyen bizarr viselkedésmód (pl. öncsonkítás, hátrafelé járás) megfigyelt eseteit is feljegyezik.

A vizsgált anyag beadását szemtükörrel vagy más, egyenértékű eszközzel végzett szemészeti vizsgálat előzi meg, amelyet a vizsgálatsorozat végén megismételnek, lehetőleg az összes állaton, de legalább a nagy dózist kapott egyedeken és a kontrollcsoport tagjain. Ha a szemben elváltozást tapasztalnak, az összes állatot megvizsgálják.

1.5.5.1. *Testtömeg és táplálék-/vízfogyasztás*

Minden állatot hetente legalább egyszer lemérnek. A felvett táplálék mennyiségét hetente legalább egyszer lemérik. Ha a vizsgált anyagot az ivóvízbe keverik, akkor a vízfogyasztást is legalább hetente lemérik. A vízfogyasztás a táplálékkal és a gyomorszondával történő bejuttatásra alapozott vizsgálatoknál is figyelembe vehető tényező, mivel ezek során az ivási szokások megváltozhatnak.

▼B

1.5.5.2. *Hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatok*

Vérmintákat vesznek egy megnevezett helyről és – amennyiben lehetséges – ezeket megfelelő feltételek mellett tárolják. A vizsgálati időszak végén az állatok elpusztítása előtt vagy annak részeként vérmintát vesznek.

A vizsgálatok elején, majd vagy havi rendszerességgel, vagy a vizsgálati időszak közepe táján és végül a vizsgálati időszak végén a következőkre kiterjedő hematológiai vizsgálatokat végezik el: hematokrit, hemoglobin-koncentráció, vörösvértestszám, leukocitaszám (teljes és differenciált vérkép), trombocitaszám, illetve a véralvadási idő/képesség mérése, protrombinidő vagy tromboplasztinidő mérése.

A szövetekben jelentkező fontosabb toxikus hatások és különösen a vesékre és a májra gyakorolt hatás vizsgálata érdekében a klinikai biokémiai értékek meghatározását minden állat vérmintáján elvégzik a vizsgálatok elején, majd vagy havi rendszerességgel, vagy a vizsgálati időszak közepe táján, és végül a vizsgálati időszak végén. A vizsgálatok az alábbi területekre terjednek ki: elektrolit-egyensúly, szénhidrát-anyagcsere, valamint máj- és vesefunkció. Az elvégzendő vizsgálatok kiválasztása függ a vizsgált anyag hatásmechanizmusa megfigyelésének módjaitól. Az állatokat a fajra meghatározott megfelelő ideig koplaltatják a vérvétel előtt. A vizsgálandó elemek: kalcium, foszfor, klorid, nátrium, kálium, éhgyomorra mért vércukor, alanin-aminotranszferáz, aszpartát-aminotranszferáz, ornitin-dekarboxiláz, gamma-glutamil-transzpeptidáz, karbamid nitrogén, albumin, vérkreatinin, összes bilirubin és összes szérumprotein.

Legalább a vizsgálatok elejére, közepére, majd a végére időzített vizeletgyűjtéssel az alábbi vizeletminta-vizsgálatokat végezik el: megjelenés, mennyiség, ozmolaritás vagy fajsúly, pH-érték, fehérjék, glukóz és vér/vérsejtek. Szükség szerint további paraméterek vizsgálatát is be lehet vezetni, a megfigyelt hatás(ok) vizsgálati körének bővítése érdekében.

Ezenfelül célszerű lehet elvégezni az általános jellegű szövetsérülések szérumjelzőinek a vizsgálatát. A megfelelő toxikológiai értékeléshez még esetlegesen szükséges további mérések és vizsgálatok közé tartozik a lipidek, hormonok elemzése, sav/bázis egyensúly, methemoglobin- és kolineszteráz-inhibitáció. A megfigyelt hatások vizsgálati körének bővítése érdekében további klinikai biokémiai vizsgálatokat lehet bevezetni. Ezeket az egyes besorolási osztályokhoz tartozó vegyi anyagokra nézve vagy eseti alapon célszerű meghatározni.

Rugalmas hozzáállásra van szükség, amely a vizsgált fajtól és az adott vizsgált anyag megfigyelt és/vagy várható hatásaitól egyaránt függ.

1.5.5.3. *Autopszia*

A vizsgálatokba bevont összes állatot teljes körű, beható autopsziának vetik alá, ideértve a következők alapos vizsgálatát: a test külső felszíne, az összes testnyílás, a koponya, a mellüreg és a hasüreg és ezek szervei. Az összes állat máját az epehólyaggal együtt, veséit, mellékveséit, heréit és mellékheréit, méhét, petefészkeit, pajzsmirigyét (a mellékpajzsmirigyekkel együtt), csecsemőmirigyét, lépét, agyát és szívét (eltekintve a haldokló és/vagy időközben leölt egyedektől) megtisztítják minden rátapadt szövettől, és a boncolást követő lehető legrövidebb időn belül megmérik a kiszáradás megelőzése érdekében.

▼B

Az alábbi testszöveteket mind a szövetek típusának megállapítása, mind pedig a szándékolt későbbi kórszövettani vizsgálatok szempontjából célszerű konzerválni a legmegfelelőbb fixálószerben: minden szövetet, amin van makroszkópikus elváltozás, az agyat (a reprezentatív részek között a nagyagyat, kisagyat és a nyúltagyat/nyúltagyi hidat), a gerincvelőt (három szinten: nyaki, mellkasi középső szakasz és ágyéktájék), a hipofízist, a szemeket, a pajzsmirigyet és mellékpajzsmirigyet, a csecsemőmirigyet, a nyelőcsövet, a nyálmirigyeket, a gyomrot, a vékony- és vastagbelet (beleértve a Peyer-plakkot), a májat, az epehólyagot, a hasnyálmirigyet, a veséket, a mellékveséket, a lépet, a szívet, a légcsövet és a tüdőket, az aortákat, ivarmirigyeket, a méhet, a járulékos ivarszerveket, a nőstények emlőmirigyeit, a prosztatát, a húgyhólyagot, a nyirokcsomókat (egyet lehetőleg a vizsgált anyag beadási útvonalába eső, egyet pedig egy attól távoli helyről véve, a keringési rendszerre gyakorolt hatások megállapításához), a perifériás idegeket (csípő vagy sípcsont környéki), lehetőleg az izomzathoz közeli helyről véve, egy metszetet a csontvelőből (és/vagy egy, friss csontvelőből felszívott mintát) és a bőrt. A klinikai és más jellegű megfigyelések alapján további testszövetek vizsgálata is szükségesnek tűnhet. A fentieken túl megőriznek minden olyan más szervet is, amelyek a vizsgált anyag ismert tulajdonságai alapján valószínűleg célszerveknek tekinthetők.

1.5.5.4. *Kórszövettani vizsgálatok*

A tartósított szerveket és szöveteket mind a kontrollcsoport, mind a magas dózissal kezelt csoport összes egyede esetében teljes kórszövettani vizsgálatnak vetik alá. Ha a magas dózissal kezelt csoport egyedei esetében a kezelésnek tulajdonítható elváltozások figyelhetők meg, ezt a vizsgálatot az összes többi, különböző dózissal kezelt csoport egyedeire is kiterjesztik.

Minden makroszkópikus elváltozást megvizsgálnak.

Ún. kiegészítő csoport használata esetén az egyedek azon szerveit és szöveteit vizsgálják meg, amelyeknél a kezelt csoportok egyedei esetében elváltozásokat lehetett kimutatni.

2. ADATOK ÉS JELENTÉSKÉSZÍTÉS

2.1. ADATOK

Minden egyes állattal kapcsolatban rögzítik az adatokat. Ezenfelül az összes adatot táblázat formájában összegzik, a vizsgált állatok minden csoportja tekintetében bemutatva, hogy hány egyeddel indult a vizsgálat, hány állat pusztult el, illetve hányat kellett elpusztítani humánus okokból a kísérlet során, valamint az elpusztulás és az elpusztítás időpontját; hány egyed mutatta toxicitás jeleit, a megfigyelt toxicitás jeleinek leírását, ideértve bármely toxikus hatás kezdetének idejét, időtartamát és súlyosságát, az elváltozásokat mutató állatok számát, az elváltozások típusát és az egyes elváltozástípusokat mutató állatok százalékos arányát.

Amennyiben lehetséges, a nyers adatokat megfelelő, általánosan elfogadott statisztikai módszerrel értékelik ki. A feldolgozandó adatokat és statisztikai módszereket már a vizsgálat tervezésének idején kiválasztják.

2.2. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés – amennyiben lehetséges – tartalmazza a következő információkat:

▼B

2.2.1. **A vizsgált anyag**

— fizikai megjelenése, tisztasága és fizikai-kémiai tulajdonságai,

— azonosító adatok,

— vivőanyag (ha van): a vivőanyag – ha az nem víz – kiválasztásának indoklása.

2.2.2. **A vizsgált fajok**

— a felhasznált állatok faja és törzse,

— az állatok száma, életkora és neme,

— az állatok eredete, tartási körülmények, étrend stb.,

— az egyes állatok testtömege a vizsgálatok kezdetekor.

2.2.3. **Vizsgálati körülmények**

— a dózisszintek megválasztásának indokai,

— a vizsgált anyag formulálásának/étrendbe való beillesztésére vonatkozó részletek, a készítmény koncentrációja, stabilitása és homogenitása,

— a vizsgált anyag adagolásának részletei,

— a tényleges dózis (mg/testtömeg kg/nap) és az étrendbe illesztett, illetve vízzel beadott vizsgált anyag koncentrációjának (ppm) a tényleges dózisra való átváltási tényezője, ha ilyen értelmezhető a vizsgálatok során,

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek.

2.2.4. **Eredmények**

— az egyedek testtömege és annak változásai,

— táplálék-/vízfogyasztásra vonatkozó adatok,

— toxikus reakcióra vonatkozó adatok, nemek és adagolási szint szerinti csoportosításban, beleértve a toxicitás jeleit,

— a klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (a változások reverzibilisek-e vagy sem)

— a szemészeti vizsgálatok eredményei,

— a hematológiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel,

— a klinikai biokémiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel,

— a végső testtömeg, szervtömegek és a szervek/testtömeghányadosok,

— boncolási leletek,

— az összes kórszövettani lelet részletes leírása,

— abszorbciós adatok, ha ilyenek rendelkezésre állnak,

— az eredmények statisztikai feldolgozása, amennyiben lehetséges.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

▼B

B.28. **SZUBKRÓNIKUS DERMÁLIS TOXICITÁSVIZSGÁLAT, 90 NAPOS, ISMÉTELT DERMÁLIS ADAGOLÁSÚ VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓFAJOKON**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot naponta a bőrre adagoljuk, fokozatosan növekvő dózisokban több kísérleti állatcsoportnak, 90 napon keresztül. A vizsgálati időszak alatt az állatokat naponta kell vizsgálni a mérgezés jeleinek észlelése érdekében. A vizsgálat ideje alatt elpusztult állatokat fel kell boncolni, a vizsgálat lezárásakor pedig a túlélő állatokat is el kell pusztítani, és fel kell boncolni.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napon keresztül a vizsgálat tartási és táplálási körülményei között kell tartani. Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell beosztani. A vizsgálat megkezdése előtt nem sokkal a törzs háti felületén le kell nyírni az állatok szőrét. Borotválni is lehet, de azt a vizsgálat megkezdése előtt megközelítőleg 24 órával kell elvégezni. A vizsgálat során általában ismételt nyírás és borotválás szükséges, rendszerint heti időközönként. A nyírás vagy borotválás során gondosan ügyelni kell arra, hogy a bőrt ne sértsük meg. A testfelület legalább 10 %-át szabaddá kell tenni a vizsgált anyag alkalmazásához. Az állat testsúlyát is tekintetbe kell venni, amikor a megtisztítandó felületről, illetve a fedőkötés méretéről döntünk. Ha szilárd anyagot vizsgálunk, amelyet adott esetben porítani is lehet, az anyagot vízzel kellően át kell nedvesíteni, vagy szükség esetén vivőanyagot kell alkalmazni annak biztosítására, hogy a bőrrel megfelelő módon érintkezzen. A folyékony vizsgálati anyagokat rendszerint hígítás nélkül kell adagolni. Az adagolás heti öt-hét alkalommal történik.

1.6.2. ***Vizsgálati körülmények***

1.6.2.1. A kísérlethez felhasznált állatok

Kifejlett patkány, nyúl vagy tengerimalac használható. Más faj is használható, de azok használatát meg kell indokolni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól, az átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözhet. Ha a szubkrónikus dermális vizsgálatot valamely hosszú távú vizsgálat előzetes vizsgálataként végezzük, mindkét vizsgálathoz ugyanazon fajt, illetve kísérleti állattörzset kell felhasználni.

▼B

1.6.2.2. Az állatok száma és neme

Minden adagolási szinthez legalább 20 egészséges bőrű állatot (10 hímet és 10 nőstényt) kell felhasználni. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Ha időközi elpusztítást tervezünk, akkor a létszámot annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el akarunk pusztítani. Ezenkívül még egy 20 fős (nemenként 10 állat) kísérő állatcsoportot is kezelhetünk a legnagyobb adaggal 90 napon át, amelyeknek állatain a kezelés után 28 nappal megfigyelhetjük a toxikus hatás visszafordíthatóságát, elhúzódó vagy késve fellépő voltát.

1.6.2.3. Adagolási szintek (dózisok)

Legalább három adagolási szintet (dózist) és egy kontrollt kell használni, illetve egy vivőanyagkontrollt, ha van vivőanyag. Az expozíciós idő legalább napi hat óra legyen. A vizsgált anyagot minden nap hasonló időpontban kell alkalmazni, az alkalmazott mennyiséget pedig meghatározott időközönként (hetente vagy kéthetente) hozzá kell igazítani az állatok növekedéséhez, hogy az állatok testsúlyához viszonyított mennyiséget fenn lehessen tartani. A vizsgált anyaggal történő kezelést kivéve a kontrollcsoportban lévő állatokkal pontosan ugyanolyan módon kell bánni, mint a vizsgálati csoportok állataival. Olyan esetekben, amikor az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot alkalmazunk, a kontrollcsoportot ugyanúgy kell a vivőanyaggal kezelni, mint a kezelt csoportokat, és ugyanannyi vivőanyagot kell kapniuk, mint a legnagyobb adaggal kezelt csoportnak. A legnagyobb adagot úgy kell kiválasztani, hogy abban jelentkeznie kell a toxikus hatásnak, de elhullások lehetőleg ne, vagy csak minimális mértékben legyenek. A legkisebb adaggal kezelt csoportban nem lehetnek a toxicitásra utaló jelek. Ha használható becslés áll rendelkezésre az emberi expozícióra vonatkozóan, a legkisebb adagnak ennél nagyobbnak kell lennie. Kedvező esetben a középső adaggal kezelt csoportnál minimális toxikus hatás észlelhető. Ha egynél több közbeeső dózist alkalmazunk, akkor azokat úgy kell kiválasztani, hogy fokozódó toxikus hatást váltsanak ki. Az alacsony és közbeeső dózisú, illetve a kontrollcsoportban az elpusztult állatok száma minimális legyen, hogy az eredmények értelmezhető értékelése lehetséges legyen.

Ha a vizsgált anyag alkalmazása súlyos bőrirritációt okoz, a koncentrációt csökkenteni kell, ami az egyéb toxikus hatások mértékének csökkenésével vagy eltűnésével járhat a legnagyobb adaggal kezelt csoportban. Ha a bőr súlyosan károsodott, szükségessé válhat a vizsgálat leállítása és egy új vizsgálat megkezdése kisebb koncentrációk mellett.

1.6.3. **Határérték-vizsgálat**

Ha az előzetes vizsgálat során napi 1 000 mg/testsúlykilogrammal adagolt vizsgált anyag vagy – ha a lehetséges emberi expozíció mértéke ismert – ennél magasabb dózis semmilyen toxikus hatást nem vált ki, a további vizsgálatok szükségtelennek tekinthetők.

1.6.4. **Megfigyelési időszak**

Az összes állatot naponta meg kell vizsgálni a toxikus hatások megjelenésének észlelése érdekében. Fel kell jegyezni az elpusztulás időpontját, valamint azt az időpontot, amikor a toxikus hatás jelei mutatkozni kezdenek, illetve elmúlnak.

▼B

1.6.5. **A kísérlet végrehajtása**

Az állatokat egyesével kell a ketrecekben elhelyezni. Ideális esetben a vizsgált anyagot heti hét alkalommal kell az állatoknak beadni, 90 napon keresztül.

A kísérő csoportokban a nyomon követő megfigyelésekre kiválasztott állatokat további 28 napig kell tartani kezelés nélkül, hogy a toxikus hatás visszafordíthatóságát, illetve elhúzódását ki lehessen mutatni. Az anyaggal való érintkezés ideje napi hat óra.

A vizsgált anyagot a testfelület megközelítőleg 10 %-át kitevő felületen egyenletesen elosztva kell felvinni az állat bőrére. Erősen mérgező anyagoknál a felület lehet ennél kisebb, de a felület lehető legnagyobb részét a lehető legvékonyabb és legegyenletesebb bevonattal kell ellátni.

Az expozíció ideje alatt a vizsgált anyagot a bőrrel egy lyukacsos gézlap segítségével és nem irritáló ragasztószalaggal kell érintkezésben tartani. A vizsgált területet megfelelő módon be kell fedni azért, hogy megmaradjon rajta a vizsgált anyag és a gézkötés, és az állatok ne nyalhassák le a vizsgált anyagot. Mozgásgátló szerkezeteket lehet használni annak megakadályozására, hogy az állat a vizsgált anyagot lenyelje, de a teljes immobilizáció mint módszer nem javasolt.

Az expozíciós idő leteltével a maradék vizsgált anyagot lehetőség szerint el kell távolítani a bőr felületének vízzel vagy más megfelelő módon történő megtisztítása útján.

Az összes állatot naponta meg kell vizsgálni, és a toxikus hatások megjelenését, súlyosságát és időtartamát rögzíteni kell. A ketrecben tartott állatok megfigyelésekor a bőr- és szőrelváltozásokra, a szemek és a nyálkahártyák változásaira, valamint a légzési, a keringési rendszerre, az autonóm és a központi idegrendszer működésére, a szomatomotoros tevékenységekre, valamint a viselkedési mintákra kell figyelemmel lenni. Hetente mérni kell a takarmányfogyasztást, valamint az állatok súlyát. Az állatok rendszeres megfigyelésére azért van szükség, hogy megelőzzük a kísérleti állatok kannibalizmus, szöveti autolízis, illetve rossz elhelyezés következtében történő elhullását. A vizsgálati időszak végeztével a kísérő csoportban lévő állatok kivételével minden túlélő állatot fel kell boncolni. A haldokló állatokat eltávolításuk után el kell pusztítani, és fel kell boncolni.

Az alábbi vizsgálatokat rendszeresen el kell végezni az összes állaton, beleértve a kontrollcsoport egyedeit is:

a) Lehetőleg minden állatot, de legalább a legnagyobb adaggal kezelt és a kontrollcsoportban lévő állatokat szemvizsgálatnak kell alávetni szemtükör vagy ezzel egyenértékű, megfelelő készülék segítségével az expozíciót megelőzően és a vizsgálat végeztével. Ha a szemen elváltozás észlelhető, akkor minden állatot meg kell vizsgálni.

b) A hematológiai vizsgálat részeként a vizsgálati időszak végeztével mérni kell a hematokrit-értéket, a hemoglobin-koncentrációt, a vörösvértestszámot, a minőségi és a teljes fehérvérsejtszámot, az alvadási képességet, beleértve az alvadási időt, a protrombin időt, a tromboplasztin időt, illetve a trombocitaszámot.

▼B

c) A vizsgálati időszak végeztével a vérmintákat klinikai-kémiai vizsgálatoknak is alá kell vetni. Fontos megvizsgálni az elektrolit-egyensúlyt, a szénhidrát-anyagcserét, a máj-, illetve a vesefunkciót. Az egyes vizsgálatok kiválasztását a vizsgált anyag hatásmechanizmusával kapcsolatos megfigyelések befolyásolják. Javasolt meghatározni: a kalcium, a foszfor, a klorid, a nátrium, a kálium szintjét, éhgyomorra kell mérni a glükózszintet (az adott fajra jellemző és megfelelő éheztetési idő után), a szérum glutaminsav szőlősav transzamináz (GPT) ([1]), a szérum glutaminsav oxálsav transzamináz (GOT) ([2]), az ornitin dekarboxiláz, a gamma glutamil-transzpeptidáz, a karbamid nitrogén, az albumin, a kreatinin, az összes bilirubin és az összes szérumfehérje szintjét szintén meg kell határozni. További meghatározások, amelyekre a pontos toxicitás értékeléséhez még szükség lehet: lipidelemzés, hormonok, sav-bázis egyensúly, methemoglobin- és kolineszteráz-aktivitás mérése. Ahol a megfigyelt hatások vizsgálatának kiterjesztéséhez szükséges, további klinikai-kémiai vizsgálatokat is lehet végezni.

d) Vizeletelemzésre általában nincs szükség, csak akkor, ha a várt vagy megfigyelt toxicitás ezt indokolja.

Ha a korábbi kísérletekből származó adatok nem megfelelőek, mérlegelendő a hematológiai és klinikai-kémiai paraméterek meghatározása az adagolás megkezdése előtt.

Autopszia

Minden állaton teljes körű makroszkópos boncolást kell végezni, amely a test külső felületének, a testnyílásoknak, valamint a koponya-, mell- és hasüregnek, illetve a bennük található szerveknek a feltárásából és vizsgálatából áll. A májat, a veséket, a mellékveséket és a heréket a kimetszés után minél előbb még nedvesen le kell mérni, a kiszáradás elkerülése miatt. Az alábbi szerveket kell megfelelő közegben tartósan tárolni egy esetleges későbbi kórszövettani vizsgálat céljaira: valamennyi olyan szerv, amelyen makroszkopikus elváltozás található, az agy – beleértve a nyúltagy, a híd, a kisagykéreg, a nagyagykéreg és az agyalapi mirigy metszeteit, a pajzsmirigy és a mellékpajzsmirigy, bármilyen jelen levő csecsemőmirigy, a légcső és a tüdő, a szív, az aorta, (a nyálmirigyek), a máj, a lép, a vesék, a mellékvesék, a hasnyálmirigy, az ivarmirigyek, a méh, (a járulékos nemi szervek), az epehólyag, ha megtalálható, a nyelőcső, a gyomor, a patkóbél, az éhbél, a csípőbél, a vakbél, a vastagbél, a végbél, a húgyhólyag, a reprezentatív nyirokcsomók, (a női emlőmirigy), (a combizomzat), a perifériás idegek, (a szemek), (a szegycsont a csontvelővel), (a combcsont az ízületi felülettel együtt), (a gerincoszlop három szinten – nyaki, mellkasközéptáji és ágyéki csigolyáknál), valamint (a szemüregen kívüli könnymirigyek). A zárójelben említett szöveteket csak akkor kell megvizsgálni, ha célszervként szerepelnek, illetve, ha a toxicitás tünetei ezt indokolják.

Kórszövettani vizsgálatok

a) Teljes körű kórszövettani vizsgálatot kell végezni a kontrollcsoport és a legnagyobb adaggal kezelt csoport állatainak bőrén, szervein és szövetein.

b) Az összes olyan szervet, amelyen makroszkopikus elváltozás található, meg kell vizsgálni.

([1]) Ma szérum alanin aminotranszferáz néven ismert.
([2]) Ma szérum aszparaginsav aminotranszferáz néven ismert.

▼B

c) A többi dóziscsoport állatainak célszerveit is meg kell vizsgálni.

d) Ha patkányokat használunk, a kis, illetve közepes dózissal kezelt csoportok állatainak tüdejét kórszövettani vizsgálatnak kell alávetni a fertőzés jeleit keresve, ez ugyanis az állat egészségi állapotának alkalmas értékelésére szolgál. E csoportok állatainál további kórszövettani vizsgálatokra rutinszerűen nincs szükség, de minden esetben vizsgálatokat kell végezni az olyan szerveken, amelyek az elváltozás jeleit mutatták a legnagyobb dózissal kezelt csoportban.

e) Ha kísérő csoportot is használunk, azokon a szöveteken és szerveken, amelyek a kezelt csoportokban elváltozásokat mutattak, itt is el kell végezni a kórszövettani vizsgálatokat.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely minden vizsgálati csoportban megadja az állatok számát a vizsgálat kezdetén, az elváltozásokat mutató állatok számát, valamint az elváltozások egyes típusait, illetve az elváltozást mutató állatok százalékos arányát. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármely elfogadott statisztikai módszer használható.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— használt faj, törzs, az állatok származása, tartási körülmények, étrend,

— vizsgálati körülmények,

— adagolás (beleértve a vivőanyagot is, ha van) és koncentrációk,

— a toxikus reakciók nemenként és dózisonként,

— lehetőség szerint az a szint, amikor még nincs toxikus hatás,

— az elpusztulás ideje a vizsgálat során, illetve hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét,

— a toxikus és más hatások leírása,

— az egyes mérgezési tünetek megfigyelésének időpontja és a megfigyelést követő változásuk,

— a takarmány fogyasztásával és a testsúly változásával kapcsolatos adatok,

— szemészeti leletek,

— az elvégzett hematológiai vizsgálatok és azok valamennyi eredménye,

— az elvégzett klinikai-kémiai vizsgálatok és azok valamennyi eredménye (beleértve az esetleges vizeletelemzés eredményeit is),

— boncolási leletek,

▼B

— a kórszövettani vizsgálatok eredményének részletes ismertetése,

— az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,

— az eredmények megvitatása,

— az eredmények értelmezése.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

▼M4

B.29. SZUBKRÓNIKUS INHALÁCIÓS TOXICITÁS: 90 NAPOS VIZSGÁLAT

ÖSSZEFOGLALÁS

A jelen felülvizsgált B.29. vizsgálati módszert úgy alakították ki, hogy azzal teljes körűen jellemezhető legyen a szubkrónikus időtartamon (90 napon) át, belégzés útján bejuttatott vizsgált vegyi anyag toxicitása, valamint megbízható adatokat lehessen gyűjteni a mennyiségi inhalációs kockázatértékelésekhez. 10 hím és 10 nőstény rágcsálóból álló csoportokat teszünk ki 90 napon (13 héten) át napi 6 órára a) a vizsgált vegyi anyagnak legalább három koncentrációszinten, b) szűrt levegőnek (negatív kontroll) és/vagy c) a vivőanyagnak (vivőanyaggal kezelt kontroll). Az állatok expozíciója általában heti 5 napon történik, azonban a hét 7 napján történő expozíció is megengedett. Mindig kell hímeket és nőstényeket is vizsgálni, azonban az egyes nemek különböző koncentrációszinteknek is kitehetők, amennyiben ismert, hogy valamelyik nem érzékenyebb a vizsgált vegyi anyagra. Ez a módszer lehetőséget biztosít a vizsgálatvezetőnek, hogy a vizsgált vegyi anyag toxicitásának alaposabb jellemzése érdekében kísérő (a visszafordíthatóság vizsgálatára alkalmazott) csoportokat, időközi elpusztításokat, bronchoalveoláris átmosást (BAL), neurológiai vizsgálatokat, valamint további klinikai kórtani és kórszövettani értékeléseket is belefoglaljon a vizsgálatba.

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 413. vizsgálati iránymutatásával (2009). A szubkrónikus inhalációs toxicitásra vonatkozó eredeti 413. vizsgálati iránymutatást 1981-ben fogadták el (1). A jelen B.29. (a felülvizsgált 413. vizsgálati iránymutatással [2009] egyenértékű) vizsgálati módszert a tudomány jelenlegi állásának megfelelően, valamint a jelenlegi és jövőbeli szabályozási igények kielégítése érdekében frissítették.

2. A szubkrónikus inhalációs toxicitási vizsgálatok elsődleges célja a munkahelyi környezetben a munkavállalókra nézve fennálló kockázat értékeléséhez használt hatósági koncentrációk meghatározása. Emellett a lakossági, közlekedési és környezeti humán kockázatok értékelésére is alkalmazzák azokat. Ez a módszer lehetővé teszi a vizsgált vegyi anyagnak 90 napon (a patkányok élettartamának körülbelül 10 %-án) át belégzés útján történő, naponta ismételt expozíció nyomán kialakuló káros hatások jellemzését. A szubkrónikus inhalációs toxicitási vizsgálatok során kapott adatok felhasználhatók mennyiségi kockázatértékelési célokra, valamint a krónikus vizsgálatok során alkalmazott koncentrációk kiválasztásához is. E vizsgálati módszer nem kifejezetten nanoanyagok vizsgálatára szolgál. Az e vizsgálati módszer összefüggésében alkalmazott fogalmak meghatározása a jelen fejezet végén, valamint a 39. iránymutatásban (2) található.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

3. A vizsgálat minőségének fokozása és az állatkísérletek minimalizálása érdekében a vizsgálati laboratóriumnak a vizsgálat elvégzése előtt figyelembe kell vennie a vizsgálandó vegyi anyagról rendelkezésre álló minden információt. A megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztását segítő információk közé tartozhat a vizsgált vegyi anyag azonossága, kémiai szerkezete, valamint fizikai és kémiai tulajdonságai, az esetleges *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei, a várható felhasználási terület(ek) és a humán expozíció lehetősége, a szerkezetileg rokon anyagokról rendelkezésre álló (Q)SAR- és toxikológiai adatok, valamint egyéb ismételt expozíciós vizsgálatokból származó adatok. Ha a vizsgálat során neurotoxicitás várható vagy figyelhető meg, a vizsgálatvezető dönthet úgy, hogy a vizsgálat részeként megfelelő értékeléseket is kell végezni, például funkcionális megfigyelési vizsgálatot (FOB) és a motoros aktivitás mérését. Az expozícióknak az egyes vizsgálatokhoz viszonyított időzítése ugyan kritikus lehet, e kiegészítő tevékenységek azonban nem szabad, hogy akadályozzák az vizsgálat alapvető tervezését.

▼M4

4. A maró vagy irritáló hatású vegyi anyagok vizsgálhatók hígítva, olyan koncentrációban, amellyel elérhető a kívánt mértékű toxicitás. További információ a 39. iránymutatásban (2) található. Az állatok ezen anyagoknak való expozíciója során a célkoncentrációknak kellően alacsonynak kell lenniük ahhoz, hogy ne okozzanak jelentős fájdalmat és szorongást, ugyanakkor elegendőnek kell lenniük ahhoz, hogy a koncentráció-hatás görbe kiterjeszthető legyen a vizsgálat szabályozási és tudományos céljának megfelelő szintekre. E koncentrációkat eseti alapon kell kiválasztani, lehetőleg egy megfelelően megtervezett tartománybehatároló vizsgálat alapján, amely információkkal szolgál a kritikus végpontról, az esetleges irritációs küszöbértékről, valamint a hatás kezdetének idejéről (lásd a 11–13. bekezdést). A választott koncentrációt indokolni kell.

5. Az elhullásközeli állapotban lévő, nyilvánvalóan fájdalmakkal küszködő vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutató állatokat humánus módon el kell pusztítani. Az elhullásközeli állapotban lévő állatokat a vizsgálat során elhullott állatokkal azonos módon kell figyelembe venni. A megjósolható vagy közeli elhullás felismerését segítő iránymutatás, valamint az elhullás közelében lévő vagy súlyosan szenvedő állatok elpusztítására vonatkozó döntési kritériumok a humánus végpontokról szóló OECD-iránymutatásban (3) találhatók.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

6. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal, ivarérett rágcsálókat kell alkalmazni. A javasolt faj a patkány. Más faj használata esetén a döntést indokolni kell.

Az állatok előkészítése

7. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. A véletlen kiválasztás napján az állatoknak 7–9 hetes fiatal, ivarérett egyedeknek kell lenniük. A testsúlyuk a nemenkénti átlagos testsúlytól legfeljebb ± 20 %-kal térhet el. Az állatokat véletlenszerűen választjuk ki, egyedi azonosítóval látjuk el, és a laboratóriumi körülményekhez való szoktatás céljából a vizsgálat megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben tartjuk.

Az állatok tartása

8. Az állatokat a megfigyelések megkönnyítése és összetévesztésük elkerülése érdekében egyedi azonosítóval, lehetőleg bőr alatti jeladóval kell ellátni. A kísérleti állatok tartására használt helyiség hőmérséklete 22 ± 3 °C kell, hogy legyen. A relatív páratartalmat ideális esetben 30–70 %-os tartományban kell tartani, ugyanakkor ez nem feltétlenül lehetséges, ha vivőanyagként vizet használunk. Az expozíció előtt és után az állatokat általában nemek és koncentrációk szerinti csoportokban kell a ketreceikben elhelyezni, azonban az állatok ketrecenkénti számának nem szabad akadályoznia az egyes állatok megfigyelését, és minimalizálnia kell a kannibalizmus és a marakodás okozta veszteségeket. Ha az állatok expozíciója csak orron át történik, szükséges lehet szoktatni azokat a lefogásukra szolgáló csövekhez. Az állatok lefogására szolgáló csövek nem okozhatnak az állatoknak indokolatlan fizikai, termális vagy a mozgásképtelenség okozta stresszt. A lefogás hatással lehet olyan fiziológiai végpontokra, mint a testhőmérséklet (hipertermia) és/vagy a percenkénti légzésvolumen. Amennyiben a rendelkezésre álló általános adatok azt igazolják, hogy ilyen változások nem lépnek fel számottevő mértékben, az állatok lefogására szolgáló csövekhez való előzetes szoktatás mellőzhető. Az aeroszoloknak egész testfelületükön kitett állatokat az expozíció során külön ketrecben kell elhelyezni, hogy a vizsgált aeroszol ne szűrődhessen át a többi állat szőrzetén. Hagyományos és minősített laboratóriumi takarmány alkalmazható – kivéve az expozíció időtartama alatt –, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást.

▼M4

Inhalációs kamrák

9. Az inhalációs kamra kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált vegyi anyag jellegét és a vizsgálat célját. Az előnyben részesítendő expozíciós mód a csak orron keresztüli expozíció (ez magában foglalja a csak a fejet, orrot vagy szájat érintő expozíciót). A csak orron keresztüli expozíció általában előnyben részesítendő a folyékony vagy szilárd aeroszolok, valamint a lecsapódva esetlegesen aeroszolt alkotó gőzök vizsgálata esetén. Előfordulhat, hogy a vizsgálat különleges céljai egész testfelületen keresztüli expozíció alkalmazásával hatékonyabban elérhetők, ezt azonban indokolni kell a vizsgálati jegyzőkönyvben. Egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamra használata esetén a légköri stabilitás biztosítása érdekében a vizsgált állatok össztérfogata nem haladhatja meg a kamra térfogatának 5 %-át. A csak orron át történő és az egész testfelületen keresztüli expozíciós technikák elveivel, valamint azok különös előnyeivel és hátrányaival a 39. iránymutatás (2) foglalkozik.

TOXICITÁSI VIZSGÁLATOK

Határkoncentrációk

10. Az akut vizsgálatoktól eltérően a szubkrónikus inhalációs toxicitási vizsgálatok esetén nincsenek meghatározott határkoncentrációk. A maximális vizsgált koncentráció kiválasztásakor a következőket kell figyelembe venni: 1) az elérhető maximális koncentráció, 2) a legrosszabb esetben fennálló humán expozíció szintje, 3) a megfelelő oxigénellátás biztosításának szükségessége és/vagy 4) állatjóléti szempontok. Amennyiben nincsenek adatokon alapuló határértékek, az 1272/2008/EK rendeletben (13) szereplő akut határértékek alkalmazhatók (azaz aeroszolok esetén legfeljebb 5 mg/l, gőzök esetén 20 mg/l, gázok esetén pedig 20 000 ppm); lásd a 39. iránymutatást (2). Amennyiben gázok vagy erősen illékony anyagok (például hűtőfolyadékok) vizsgálata esetén e határértékeket túl kell lépni, a döntést indokolni kell. A határkoncentrációnak egyértelmű toxicitást kell előidéznie anélkül, hogy az állatoknak indokolatlan stresszt okozna vagy befolyásolná az élettartamukat (3).

Tartománybehatároló vizsgálat

11. A fő vizsgálat megkezdése előtt általában tartománybehatároló vizsgálat elvégzése szükséges. A tartománybehatároló vizsgálat átfogóbb a dózisbehatároló vizsgálatnál, mivel nem korlátozódik a koncentráció kiválasztására. A tartománybehatároló vizsgálat révén szerzett információk hozzájárulhatnak a fő vizsgálat sikeréhez. A tartománybehatároló vizsgálat például technikai jellegű információkkal szolgálhat az analitikai módszerek, a részecskeméretezés, a toxikus hatásmechanizmusok felismerése, a klinikai kórtani és kórszövettani adatok, valamint a fő vizsgálat lehetséges NOAEL- és MTC-koncentrációinak becslése vonatkozásában. A vizsgálatvezető a tartománybehatároló vizsgálatot alkalmazhatja a légzőrendszer irritációs küszöbértékének (például a légzőrendszer kórszövettani elemzése, a tüdő működésének vizsgálata vagy bronchoalveoláris átmosás útján történő) meghatározása, az állatoknak indokolatlan stresszt nem okozó, elfogadható maximális koncentráció, valamint a vizsgált vegyi anyag toxicitását legjobban jellemző paraméterek meghatározása céljából.

12. A tartománybehatároló vizsgálat egy vagy több koncentrációszintre is kiterjedhet. A választott végponttól függően mindegyik koncentrációszintnek 3–6 hímet és 3–6 nőstényt kell kitenni. A tartománybehatároló vizsgálatnak legalább 5 napig kell tartania, és általában nem tarthat tovább 28 napnál. A vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell a fő vizsgálathoz kiválasztott koncentrációk indokolását. A fő vizsgálat célja a koncentráció-válasz összefüggésnek a feltételezett legérzékenyebb végpont alapján történő kimutatása. Alsó koncentrációként lehetőleg olyan koncentráció választandó, amelynél nem észlelhető káros hatás, míg a felső koncentrációnak egyértelmű toxicitást kell előidéznie anélkül, hogy az állatoknak indokolatlan stresszt okozna vagy befolyásolná az élettartamukat (3).

▼M4

13. A tartománybehatároló vizsgálat során alkalmazandó koncentrációszintek kiválasztásakor figyelembe kell venni minden rendelkezésre álló információt, beleértve a szerkezet-aktivitás összefüggéseket és a hasonló vegyi anyagok adatait (lásd a 3. bekezdést). A tartománybehatároló vizsgálat megerősítheti, illetve megcáfolhatja a legérzékenyebbnek vélt mechanisztikai alapú végpontokat, például az organofoszfátok kolineszterázgátló hatását, a vörösvérsejtekre toxikus anyagok okozta methemoglobinképződést, a pajzsmirigyre toxikus anyagok esetén a pajzsmirigyhormonokat (T_3, T_4), a fehérjét, az LDH-t, vagy az ártalmatlan, nehezen oldható részecskék vagy a tüdőt irritáló aeroszolok esetén a bronchoalveoláris átmosási folyadékban lévő neutrofileket.

Fő vizsgálat

14. A fő szubkrónikus toxicitási vizsgálat általában három koncentrációszintre, valamint szükség szerint azokkal párhuzamosan vizsgált negatív (levegővel kezelt) és/vagy vivőanyaggal kezelt kontrollokra terjed ki (lásd a 18. bekezdést). A megfelelő expozíciós szintek kiválasztásának elősegítéséhez fel kell használni minden rendelkezésre álló adatot, beleértve a szisztémás toxicitási vizsgálatok eredményeit, az anyagcserére vonatkozó és kinetikai adatokat (különös hangsúlyt kell fektetni a kinetikai folyamatokat telítő magas koncentrációszintek elkerülésére). Mindegyik vizsgált csoport 10 hím és 10 nőstény rágcsálóból áll, amelyeket hetente 5 napon napi 6 órára teszünk ki a vizsgált vegyi anyagnak 13 héten keresztül (a vizsgálat teljes időtartama 90 nap). Az állatok heti 7 napon is kitehetők a vizsgált anyagnak (például belélegezhető gyógyszerek vizsgálata esetén). Amennyiben ismert, hogy valamelyik nem érzékenyebb a vizsgált vegyi anyagra, az egyes nemek különböző koncentrációszinteknek is kitehetők a 15. bekezdésben ismertetett koncentráció-válasz összefüggés optimális feltárása érdekében. Patkányoktól eltérő rágcsálófajok csak orron át történő expozíciója esetén az expozíció maximális időtartama kiigazítható a fajspecifikus szorongás minimalizálása érdekében. Napi 6 óránál rövidebb expozíciós idő alkalmazása vagy hosszabb időtartamú (például napi 22 órás), egész testfelületen keresztüli expozíciós vizsgálat szükségessége esetén indokolást kell adni (lásd a 39. iránymutatást) (2). Az expozíció időtartama alatt az állatok nem kaphatnak takarmányt, kivéve, ha az időtartam meghaladja a 6 órát. Az állatoknak víz az egész testfelületen keresztüli expozíció teljes időtartama alatt adható.

15. A célkoncentrációkat úgy kell megválasztani, hogy azonosítható(k) legyen(ek) a célszerv(ek) és egyértelmű koncentráció-válasz összefüggés legyen kimutatható:

— A felső koncentrációszintnek toxikus hatásokat kell előidéznie anélkül, hogy késleltetett tüneteket vagy elhullást okozna, ami kizárná az érdemi értékelést.

— A köztes koncentrációszint(ek)et úgy kell felosztani, hogy a toxikus hatások fokozatosan növekedjenek az alsó és a felső koncentrációszint között.

— Az alsó koncentrációszint nem, vagy csak kis mértékben idézheti elő toxicitás jeleit.

Időközi elpusztítás

16. Ha időközi elpusztítást tervezünk, az egyes expozíciós szintekhez tartozó állatok számát annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el szándékozunk pusztítani. Az időközi elpusztítást indokolni kell, és a statisztikai elemzések során megfelelően figyelembe kell venni.

▼M4

Kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálat

17. Kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálat végezhető a toxicitás visszafordíthatóságának, elhúzódó vagy késve fellépő voltának a kezelést követő megfelelő hosszúságú, de legalább 14 napos időszak során történő megfigyelése érdekében. A kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálathoz használt csoportok 10 hímből és 10 nőstényből állnak, amelyeket a fő vizsgálatban megfigyelt kísérleti állatokkal egyidejűleg teszünk ki a vizsgált vegyi anyagnak. A kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálathoz használt csoportokat a legnagyobb koncentrációban kell kitenni a vizsgált vegyi anyagnak, és ezzel párhuzamosan szükség szerint levegővel és/vagy vivőanyaggal kezelt kontrollok vizsgálatát is el kell végezni (lásd a 18. bekezdést).

Kontrollállatok

18. A párhuzamosan vizsgált negatív (levegővel kezelt) kontrollállatokat a vizsgált csoportokban lévő állatokkal azonos módon kell kezelni, azzal a különbséggel, hogy a vizsgált vegyi anyag helyett szűrt levegőnek tesszük ki azokat. Amennyiben vizet vagy más anyagot használunk a vizsgálati légkör létrehozásának elősegítésére, a vizsgálathoz negatív (levegővel kezelt) kontrollcsoport helyett vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportot kell alkalmazni. Vivőanyagként lehetőség szerint vizet kell használni. Ha a vivőanyag víz, a kontrollállatokat ugyanolyan relatív páratartalmú levegőnek kell kitenni, mint a vizsgált anyagnak kitett csoportokat. Az alkalmas vivőanyag kiválasztásának megfelelően elvégzett előzetes vizsgálaton vagy múltbeli adatokon kell alapulnia. Ha a vivőanyag toxicitásáról nincsenek részletes információk, a vizsgálatvezető dönthet úgy, hogy negatív (levegővel kezelt) és vivőanyaggal kezelt kontrollt egyaránt kell alkalmazni, ez azonban erősen ellenjavallt. Ha a múltbeli adatok alapján a vivőanyag nem toxikus, nincs szükség negatív (levegővel kezelt) kontrollcsoportra, és ez esetben csak vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportot kell alkalmazni. Amennyiben a vivőanyaggal kevert vizsgált vegyi anyag az előzetes vizsgálat alapján nem bizonyul toxikusnak, a vizsgált koncentráció mellett a vivőanyag sem tekintendő toxikusnak, és ezt a vivőanyagkontrollt kell használni.

EXPOZÍCIÓS KÖRÜLMÉNYEK

A koncentrációk beadása

19. Az állatokat gáz, gőz, aeroszol vagy ezek keveréke formájában tesszük ki a vizsgált vegyi anyagnak. A vizsgálandó halmazállapot a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, a kiválasztott koncentrációktól és/vagy a vizsgált vegyi anyag kezelése és használata során legnagyobb valószínűséggel előforduló halmazállapottól függ. A higroszkopikus és kémiailag reakcióképes vizsgált vegyi anyagokat száraz levegős körülmények között kell vizsgálni. Ügyelni kell a robbanékony koncentrációk keletkezésének elkerülésére. A részecskéket képző anyagok mechanikai eljárásoknak vethetők alá a részecskeméret csökkentése érdekében. További útmutatás a 39. iránymutatásban (2) olvasható.

Részecskeméret-eloszlás

20. Minden aeroszol, valamint a lecsapódva esetlegesen aeroszolt alkotó gőzök esetén részecskeméretezést kell végezni. A légzőrendszer összes lényeges részének expozíciója érdekében 1 és 3 μm közötti tömegfelező aerodinamikai átmérővel (MMAD) rendelkező, az 1,5 és 3,0 közötti tartományba eső geometriai szórású (σ_g) aeroszolok használata javasolt (4). Habár ésszerű keretek között törekedni kell az e szabványnak való megfelelésre, szakértői megítélésre kell hagyatkozni, ha erre nincs lehetőség. A fémgőzök részecskéi például kisebbek e szabványos méretnél, míg a töltéssel rendelkező részecskék és a rostok meghaladhatják azt.

▼M4

A vizsgált vegyi anyag előkészítése vivőanyagban

21. A vizsgált vegyi anyag ideális esetben vivőanyag nélkül vizsgálandó. Ha a vizsgált vegyi anyag megfelelő koncentrációjának és részecskeméretének előállításához vivőanyag alkalmazása szükséges, a víz részesítendő előnyben. Ha a vizsgált vegyi anyagot vivőanyagban oldjuk fel, minden esetben igazolni kell annak stabilitását.

AZ EXPOZÍCIÓS KÖRÜLMÉNYEK NYOMON KÖVETÉSE

Kamrabeli légáramlás

22. Az expozíciós kamrán keresztüli légáramlást gondosan szabályozni kell, folyamatosan nyomon kell követni, és minden expozíció során legalább óránként fel kell jegyezni. A vizsgálati légköri koncentráció (vagy időbeli stabilitás) valós idejű nyomon követése valamennyi dinamikus paraméter globális mérését jelenti, és közvetett lehetőséget nyújt valamennyi lényeges dinamikus inhalációs paraméter szabályozására. A koncentráció valós idejű nyomon követése esetén a légáramlásokat elegendő expozíciónként és naponként egy alkalommal mérni. Különös figyelmet kell fordítani a csak orron át történő expozícióra szolgáló kamrában az újbóli belélegzés elkerülésére. Az oxigénkoncentrációnak legalább 19 %-nak kell lennie, a szén-dioxid-koncentráció pedig legfeljebb 1 % lehet. Amennyiben feltételezhető, hogy ez a szabvány nem teljesíthető, az oxigén- és szén-dioxid-koncentrációt mérni kell. Ha az expozíció első napján végzett mérések azt mutatják, hogy e gázok szintje megfelelő, rendszerint nincs szükség további mérésekre.

A kamra hőmérséklete és relatív páratartalma

23. A kamra hőmérsékletét 22 ± 3 °C-on kell tartani. Az állatok belégzési zónájában fennálló relatív páratartalmat a csak orron át történő és az egész testfelületen keresztüli expozíció esetén egyaránt folyamatosan nyomon kell követni, és lehetőség szerint minden expozíció során óránként fel kell jegyezni. A relatív páratartalmat lehetőleg 30–70 %-os tartományban kell tartani, ugyanakkor előfordulhat, hogy ez vagy nem érhető el (például vízalapú keverékek vizsgálata esetén), vagy nem mérhető a vizsgált vegyi anyag vizsgálati módszerrel való interferenciája miatt.

Vizsgált vegyi anyag: névleges koncentráció

24. Az expozíciós kamrában fennálló névleges koncentrációt lehetőség szerint ki kell számítani és fel kell jegyezni. A névleges koncentrációt úgy kapjuk meg, hogy az előállított vizsgált vegyi anyag tömegét elosztjuk az inhalációs kamrarendszeren áthaladt levegő össztérfogatával. A névleges koncentráció nem az állatok expozíciójának jellemzésére szolgál, ugyanakkor a névleges és a tényleges koncentráció összehasonlításával megismerhető a vizsgálati rendszer előállítási hatásfoka, és így feltárhatók az előállítással összefüggő problémák.

Vizsgált vegyi anyag: tényleges koncentráció

25. A tényleges koncentráció a vizsgált vegyi anyagnak az inhalációs kamrán belül, az állatok belégzési zónájában végzett mintavétellel megállapított koncentrációját jelenti. A tényleges koncentráció vagy specifikus módszerekkel (például közvetlen mintavétellel, adszorpciós vagy kémiai reakcióképességet vizsgáló módszerekkel, valamint utólagos analitikai jellemzéssel), vagy nem specifikus módszerekkel, például gravimetriai szűrőelemzéssel határozható meg. A gravimetriai elemzés csak egykomponensű, por alakú aeroszolok, illetve alacsony illékonyságú folyadékok aeroszoljai esetén elfogadható, és alkalmazását a vizsgált vegyi anyag megfelelő, a vizsgálat előtt

▼M4

végzett jellemzésével kell alátámasztani. A gravimetriai elemzés a többkomponensű, por alakú aeroszolok koncentrációjának meghatározására szintén alkalmazható. Ebben az esetben azonban analitikai adatokkal kell alátámasztani, hogy a levegőben lévő anyag összetétele hasonló a kiindulási anyagéhoz. Amennyiben ilyen információ nem áll rendelkezésre, a (lehetőleg levegőben lebegő) vizsgált vegyi anyag rendszeres időközönként végzett újbóli elemzésére lehet szükség a vizsgálat során. Olyan aeroszolizálódott ágensek esetén, amelyek elpárologhatnak vagy szublimálhatnak, igazolni kell, hogy mindegyik fázisból a választott módszerrel vettünk mintát.

26. Lehetőség szerint a vizsgált vegyi anyag egyetlen tételét kell használni a vizsgálat teljes időtartama alatt, és a vizsgált mintát olyan körülmények között kell tárolni, hogy megőrződjön annak tisztasága, homogenitása és stabilitása. A vizsgálat megkezdését megelőzően el kell végezni a vizsgált vegyi anyag jellemzését, meghatározva többek között annak tisztaságát, valamint amennyiben technikailag lehetséges, az észlelt szennyező anyagok és szennyeződések azonosságát és mennyiségét. Ez többek között – de nem kizárólag – a következő adatokkal mutatható ki: retenciós idő és relatív csúcsterület, tömegspektroszkópiai vagy gázkromatográfiás elemzéssel, illetve más becslésekkel meghatározott molekulatömeg. Bár a vizsgált minta azonosságának meghatározása nem tartozik a vizsgálati laboratórium feladatai közé, óvatosságból érdemes lehet a vizsgálati laboratóriumban legalábbis korlátozott módon (például szín, fizikai jelleg stb. alapján) megerősíteni a megbízó által adott jellemzést.

27. Az expozíciós légkört amennyire csak lehet, állandó állapotban kell tartani. Az expozíciós körülmények stabilitásának bizonyítására valós idejű nyomonkövetési eszköz – például aeroszolok esetén aeroszolfotométer, vagy gőzök esetén az összes szénhidrogéntartalmat elemző műszer – alkalmazható. A kamrabeli tényleges koncentrációt minden expozíciós napon minden expozíciós szint tekintetében legalább háromszor meg kell mérni. Ha az alacsony légáramlási sebesség vagy koncentráció miatt ez nem megoldható, expozíciós időszakonként egy mintavétel is elfogadható. Ideális esetben ezt a mintavételt a teljes expozíciós időszak folyamán kell elvégezni. Az egyes kamrakoncentráció-minták gázok és gőzök esetén legfeljebb ± 10 %-kal, folyékony vagy szilárd aeroszolok esetén pedig legfeljebb ± 20 %-kal térhetnek el a kamrabeli átlagkoncentrációtól. A kamra egyensúlyi állapotának kialakulásához szükséges időt (t_{95}) ki kell számítani és jegyzőkönyvezni kell. Egy adott expozíció időtartama magában foglalja a vizsgált vegyi anyag előállításának idejét. Ehhez figyelembe kell venni a kamra egyensúlyi állapotának eléréséhez és a bomláshoz szükséges időt (t_{95}). A t_{95} becsléséhez a 39. iránymutatásban (2) található útmutatás.

28. A nagyon összetett, gázokból/gőzökből és aeroszolokból álló keverékek (például égési légkörök, valamint meghatározott célra szolgáló végfelhasználói termékekből/készülékekből kibocsátott vizsgált vegyi anyagok) esetén az egyes fázisok eltérően viselkedhetnek az inhalációs kamrában. Éppen ezért mindegyik fázishoz (gáz/gőz és aeroszol) legalább egy indikátoranyagot (analitot) – általában a keverék elsődleges hatóanyagát – kell kiválasztani. Amennyiben a vizsgált vegyi anyag keverék, az analitikai koncentrációt a teljes keverék, nem pedig csak az aktív összetevő vagy az indikátoranyag (analit) vonatkozásában kell a jegyzőkönyvben feltüntetni. A tényleges koncentrációról további információ a 39. iránymutatásban található (2).

Vizsgált vegyi anyag: részecskeméret-eloszlás

29. Az aeroszolok részecskeméret-eloszlását mindegyik koncentrációszint tekintetében legalább hetente meg kell határozni sorozatos ütközésmérő vagy alternatív műszer, például aerodinamikai részecskeméret-meghatározó (APS) segítségével. Ha bizonyítható, hogy a sorozatos ütközésmérővel és az alternatív műszerrel kapott eredmények egyeznek, az alternatív műszer a teljes vizsgálat folyamán használható.

▼M4

30. Az elsődleges műszerrel párhuzamosan egy második eszközt, például gravimetriai szűrőt vagy impingert/gázburborékoltatót kell használni az elsődleges műszer mintavételi hatékonyságának megerősítése érdekében. A részecskeméret-elemzés útján kapott tömegkoncentrációnak a szűrőelemzéssel kapott tömegkoncentrációt ésszerű mértékben meg kell közelítenie (lásd a 39. iránymutatást (2)). Ha a vizsgálat kezdeti szakaszában vizsgált összes koncentrációnál bizonyítható az egyezés, a további megerősítő mérések mellőzhetők. Az állatok jóléte érdekében intézkedéseket kell tenni a vizsgálat eseteges megismétlését szükségessé tevő kétes adatok előfordulásának minimalizálása érdekében.

31. Gőzök esetén részecskeméretezést kell végezni, ha fennáll annak a lehetősége, hogy a gőz lecsapódásával aeroszol keletkezhet, vagy ha vegyes fázisok alkotására képes részecskéket észlelünk a gőzatmoszférában.

MEGFIGYELÉSEK

32. Az állatokat az expozíciós időtartam előtt, alatt és után klinikai megfigyeléseknek kell alávetni. Az állatok expozíció során megfigyelt reakciójától függően gyakoribb megfigyelések is kilátásba helyezhetők. Ha az állatok megfigyelését az azok lefogására szolgáló csövek használata, az egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamra rossz megvilágítása vagy az átlátszatlan légkör akadályozza, az állatokat az expozíció után alapos megfigyelésnek kell alávetni. A következő napi expozíció előtt végzett megfigyelésekkel felmérhető a toxikus hatások visszafordíthatósága vagy súlyosbodása.

33. Minden megfigyelést rögzíteni kell olyan módon, hogy minden állat esetében önálló adatsort veszünk fel. Ha az állatokat humánus okok miatt el kell pusztítani, vagy ha azok elhullnak, a lehető legpontosabban fel kell jegyezni az elhullás időpontját.

34. A ketrecben tartott állatok megfigyelésének ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártya, a légző-, keringési és idegrendszer, valamint a szomatomotoros aktivitás és a viselkedési minták változásaira. Figyelmet kell szentelni a remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma megfigyelésére. A végbélben mért hőmérséklet bizonyítékot szolgáltathat a kezelés vagy a fogság okozta bradipnoés reflexre vagy hipo-/hipertermiára. A vizsgálati protokollba további értékelések is felvehetők, ilyenek például a kinetikai vizsgálatok, a biomonitoring, a tüdőműködés vizsgálata, a tüdőszövetben felgyülemlő, rosszul oldható anyagok visszamaradásának vizsgálata, valamint a viselkedésbeli változások megfigyelése.

TESTSÚLY

35. Az egyes állatok súlyát röviddel az első expozíció (0. nap) előtt, azt követően pedig hetente kétszer (például az expozíció nélküli hétvégén végbement felépülés bizonyítása céljából pénteken és hétfőn, vagy a szisztémás toxicitás felmérését lehetővé tevő időközönként), valamint az elhullás vagy elpusztítás időpontjában kell feljegyezni. Amennyiben az első 4 héten semmilyen hatás nem figyelhető meg, a vizsgálat hátralevő részében a testsúly heti rendszerességgel is mérhető. A kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálatban alkalmazott állatok (ha vannak) súlyának heti rendszerességgel végzett mérését a felépülési időszak során is folytatni kell. A vizsgálat lezárásakor minden állat súlyát meg kell mérni röviddel az elpusztítás előtt, hogy torzításmentesen kiszámítható legyen a szervek súlyának testsúlyhoz viszonyított aránya.

TÁPLÁLÉK- ÉS VÍZFOGYASZTÁS

36. A felvett táplálék mennyiségét heti rendszerességgel le kell mérni. A felvett víz mennyisége szintén mérhető.

▼M4

KLINIKAI PATOLÓGIA

37. Minden állaton – beleértve a kontrollokat és a kísérő (visszafordíthatósági) csoportokba tartozókat – klinikai patológiai értékelést kell végezni az elpusztításkor. Az expozíció vége és a vérvétel között eltelt időt fel kell jegyezni, különösen ha az adott végpontra gyors regeneráció jellemző. A rövid plazmabeli felezési idejű paramétereknél (például COHb, CHE és MetHb) az expozíció végét követően végzendő mintavétel.

38. A minden toxikológiai vizsgálathoz általánosan előírt klinikai patológiai paraméterek felsorolása az 1. táblázatban található. Rendszeres vizeletelemzés nem kötelező, de elvégezhető, ha a várt vagy megfigyelt toxicitás alapján célszerűnek ítéljük. A vizsgálatvezető a vizsgált vegyi anyag toxicitásának alaposabb jellemzése érdekében további paraméterek értékelése mellett dönthet (például kolineszteráz, lipidek, hormonok, sav-bázis egyensúly, methemoglobin vagy Heinz-testek, kreatin-kináz, csontvelő/eritroid arány, troponinok, artériás vérgáz, laktát-dehidrogenáz, szorbit-dehidrogenáz, glutamát-dehidrogenáz és gamma-glutamil-transzpeptidáz).

1. táblázat

Szabványos klinikai patológiai paraméterek

Hematológiai paraméterek	
vörösvértestszám	teljes vérkép
hematokrit	differenciált vérkép
hemoglobinkoncentráció	trombocitaszám
átlagos korpuszkuláris hemoglobin	véralvadási képesség (a következők egyikét kell választani):
átlagos korpuszkuláris térfogat	— prothrombin idő
átlagos korpuszkuláris hemoglobinkoncentráció	— véralvadási idő
retikulociták	— részleges prothrombin idő

Klinikai kémiai paraméterek	
glükóz (*)	alanin-aminotranszferáz
összes koleszterin	aszpartát-aminotranszferáz
trigliceridek	alkáli foszfatáz
a vérben lévő karbamid-nitrogén	kálium
összes bilirubin	nátrium
kreatinin	kalcium
összes fehérje	foszfor
albumin	klorid
globulin	

Vizeletelemzés (nem kötelező)	
megjelenés (szín és zavarosság)	összes fehérje
térfogat	glükóz
fajsúly vagy ozmolaitás	vér/vérsejtek
pH	

(*) Mivel a hosszas koplaltatás torzíthatja a kezelt állatok glükózszintjének a kontrollállatokéhoz viszonyítva mért értékét, a vizsgálatvezetőnek döntenie kell, hogy célszerű-e az állatokat koplaltatni. Koplaltatási idő alkalmazása esetén annak a vizsgált fajhoz kell igazodnia, patkány esetén például 16 óra lehet (éjszakai koplaltatás). A koplaltatás mellett mérhető glükózszint meghatározása az utolsó expozíciós héten történő éjszakai koplaltatás után, vagy a boncolás előtti éjszakai koplaltatás után végezhető el (utóbbi esetben az összes többi klinikai patológiai paraméterrel együtt kell meghatározni).

▼M4

39. Amennyiben arra utaló bizonyítékot találunk, hogy az alsó légutak (azaz az alveolusok) jelentik a lerakódás és a visszamaradás elsődleges helyét, a bronchoalveoláris átmosás (BAL) lehet a legalkalmasabb technika a hipotézisen alapuló dózis-hatás paraméterek alveolitiszre, tüdőgyulladásra és foszfolipidózisra összpontosító mennyiségi elemzéséhez. Ez lehetővé teszi az alveolusok károsodása dózis-válasz és idő-lefolyás típusú változásainak megfelelő vizsgálatát. A BAL eljárás útján nyert folyadék elemezhető teljes és differenciált vérkép, összes fehérje, valamint laktát-dehidrogenáz tekintetében. Figyelembe vehetők továbbá egyéb, lizoszómakárosodásra, foszfolipidózisra, fibrózisra, valamint irritáció okozta vagy allergiás gyulladásra utaló paraméterek is, ami magában foglalhatja a gyulladást serkentő citokinek/kemokinek meghatározását. A BAL-mérések általában kiegészítik a kórszövettani vizsgálatok eredményeit, azonban nem helyettesíthetik azokat. A tüdőátmosás elvégzéséhez a 39. iránymutatásban (2) található útmutatás.

SZEMÉSZETI VIZSGÁLAT

40. A vizsgált vegyi anyag beadása előtt az összes állaton, továbbá az összes, magas koncentrációnak kitett és kontrollcsoport esetén a vizsgálat lezárásakor oftalmoszkóppal vagy azzal egyenértékű eszközzel el kell végezni a szemfenék, a fénytörő közegek, a szivárványhártya és a kötőhártya szemészeti vizsgálatát. Amennyiben a szem elváltozásait észleljük, a többi csoportba tartozó összes állatot is meg kell vizsgálni, beleértve a kísérő (visszafordíthatósági) csoportba tartozókat.

MAKROSZKOPIKUS PATOLÓGIA ÉS A SZERVEK SÚLYA

41. Minden kísérleti állaton teljes kivéreztetést és (ha lehetséges) makroszkopikus boncolást kell végezni, beleértve azokat is, amelyek a vizsgálat során elpusztultak, vagy amelyeket állatjóléti okok miatt el kellett távolítani a vizsgálatból. Minden egyes állatnál fel kell jegyezni az utolsó expozíció és az elpusztítás között eltelt időt. Ha a boncolás nem végezhető el rögtön azután, hogy az elpusztult állatot észrevettük, az állatot hűtve (nem fagyasztva) kell tárolni az autolízis minimalizálásához kellően alacsony hőmérsékleten. A boncolást a lehető leghamarabb, általában egy vagy két napon belül el kell végezni. Minden állat esetén fel kell jegyezni minden makroszkopikus patológiai elváltozást, különös tekintettel a légzőrendszert érintő változásokra.

42. A makroszkopikus boncolás során kórszövettani vizsgálat céljából megfelelő közegben megőrizendő szervek és szövetek felsorolása a 2. táblázatban található. A **[**szögletes zárójelben**]** feltüntetett szervek és szövetek, valamint bármely egyéb szerv és szövet megőrzéséről a vizsgálatvezető saját mérlegelése alapján dönthet. A **félkövérrel** szedett szerveket a kiszáradás elkerülése érdekében a boncolás után a lehető legrövidebb időn belül meg kell tisztítani, és azok nedves súlyát meg kell mérni. A pajzsmirigy és a mellékherék súlyát csak akkor javasolt megmérni, ha szükséges, mivel az azok megtisztítása során keletkező mesterséges elváltozások akadályozhatják a kórszövettani értékelést. A szöveteket és a szerveket közvetlenül a boncolás után, és az alkalmazandó fixálószertől függően legalább 24–48 órával a megtisztítás előtt 10 %-os pufferelt formalinban vagy egyéb, megfelelő fixálószerben fixálni kell.

▼M4

2. táblázat

A makroszkopikus boncolás során megőrizendő szervek és szövetek

Mellékvesék	Nyelőcső
Aorta	[Szaglógumó]
Csontvelő (és/vagy friss felszívott minta)	**Petefészkek**
Agy (beleértve a nagyagy, a kisagy és a nyúltvelő/nyúltagyi híd metszeteit)	Hasnyálmirigy
Vakbél	Mellékpajzsmirigyek
Vastagbél	Perifériás ideg (csípő vagy sípcsont környéki, lehetőleg az izomzathoz közeli helyről véve)
Patkóbél	Agyalapi mirigy
[**Mellékherék**]	Prosztata
[Szemek (retina, látóideg) és szemhéjak]	Végbél
Combcsont és térdízület	Nyálmirigyek
Epehólyag (ha van)	Ondóhólyagok
[Harder-mirigyek]	Bőr
Szív	Gerincoszlop (nyaki, mellkasi középső és ágyéki szakasz)
Csípőbél	**Lép**
Éhbél	Szegycsont
Vesék	Gyomor
[Könnymirigyek (szemüregen kívüli)]	Fogazat
Gégefő (3 szinten, beleértve a gégefedő alapját)	**Herék**
Máj	**Csecsemőmirigy**
Tüdő (egy szinten készített metszet mindegyik lebenyről, beleértve a fő hörgőket)	**Pajzsmirigyek**
Nyirokcsomók a tüdő hilusok körüli részéről, különösen nehezen oldható, szemcsés vizsgált vegyi anyagok esetén. Alaposabb vizsgálatok és/vagy immunológiára összpontosító tanulmányok esetében további nyirokcsomók megőrzése is megfontolható, például a gátori, nyaki/állkapocs alatti és/vagy fülcse körüli részekről.	[Nyelv]
	Légcső (legalább 2 szinten, beleértve egy hosszirányú metszetet a carinán keresztül, valamint egy keresztmetszetet)
Nyirokcsomók (a bejutás helyétől távoli helyről)	[Húgyvezeték]
Emlőmirigy (nőstény)	[Húgycső]
Izomszövet (comb)	Húgyhólyag
Orr-garati szövetek (legalább 4 szinten, amelyek egyikének tartalmaznia kell az orr-garati csatornát és az orrhoz társuló nyirokszövetet [NALT])	**Méh**
	Célszervek
	Minden makroszkopikus elváltozás és szövetszaporulat

▼M4

43. A tüdőt sértetlenül kell eltávolítani, le kell mérni, és a tüdő szerkezetének megőrzése érdekében megfelelő fixálószert kell belecsepegtetni 20–30 cm víznek megfelelő nyomáson (5). Mindegyik lebenyről metszetet kell készíteni egy szinten, beleértve a fő hörgőket, ugyanakkor tüdőátmosás alkalmazása esetén az át nem mosott lebenyről három szinten kell metszetet készíteni (nem sorozatos metszeteket).

44. Az orr-garati szöveteket legalább 4 szinten kell vizsgálni, amelyek egyikének tartalmaznia kell az orr-garati csatornát (5) (6) (7) (8) (9), lehetővé téve a laphámsejtes, átmeneti (csillószőrrel nem borított légúti), légúti (csillószőrrel borított) és szaglóhámszövet, valamint az elvezető nyirokszövet (NALT) (10) (11) megfelelő vizsgálatát. A gégefőt három szinten kell vizsgálni, amelyek egyikének tartalmaznia kell a gégefedő alapját (12). A légcsövet legalább két szinten kell vizsgálni, beleértve egy hosszirányú metszetet az extrapulmonális hörgők elágazásánál lévő carinán keresztül, valamint egy keresztmetszetet.

KÓRSZÖVETTANI VIZSGÁLATOK

45. A 2. táblázatban felsorolt összes szerv és szövet kórszövettani vizsgálatát el kell végezni a kontrollcsoportoknál és a magas koncentrációnak kitett csoportoknál, valamint a vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított összes állatnál. Különös figyelmet kell fordítani a légzőrendszerre, a célszervekre, valamint a makroszkopikus elváltozásokra. Azon szerveket és szöveteket, amelyeken a magas koncentrációnak kitett csoportnál elváltozások figyelhetők meg, mindegyik csoportnál meg kell vizsgálni. A vizsgálatvezető a koncentráció-válasz összefüggés egyértelmű kimutatása érdekében dönthet úgy, hogy további csoportoknál is végezni kell kórszövettani értékelést. Kísérő (visszafordíthatóság vizsgálatára szolgáló) csoport alkalmazása esetén minden olyan szerv és szövet kórszövettani értékelését el kell végezni, amelynél a kezelt csoportok egyedei esetében elváltozások figyelhetők meg. Ha a magas koncentrációnak kitett csoportnál túlzott mértékű idő előtti elhullás vagy egyéb problémák veszélyeztetik az adatok szignifikanciáját, az eggyel alacsonyabb koncentrációra vonatkozóan kell kórszövettani vizsgálatot végezni. Meg kell kísérelni a makroszkopikus és mikroszkopikus megfigyelések közötti összefüggések feltárását.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

46. Meg kell adni az egyes állatok testsúlyára, táplálékfelvételére, klinikai patológiai eredményeire, makroszkopikus boncolási eredményeire, szerveinek súlyára, valamint kórszövettani eredményeire vonatkozó adatokat. A klinikai megfigyelések adatait táblázatos formában össze kell foglalni, minden egyes vizsgált csoporthoz megadva a csoportban lévő állatok számát, a specifikus mérgezési tüneteket mutató, valamint a vizsgálat során elhullott vagy humánus okokból elpusztított állatok számát, az egyes állatok elhullásának időpontját, a toxikus hatások leírását, időbeli lefolyását és visszafordíthatóságát, valamint a boncolások eredményeit. Mind a számszerű, mind a járulékos eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell kiértékelni. Bármilyen általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazható, és a statisztikai módszereket a vizsgálat tervezésekor kell kiválasztani.

Vizsgálati jegyzőkönyv

47. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell értelemszerűen tartalmaznia:

Kísérleti állatok és azok tartása

— A ketrecben való tartás körülményei, beleértve a következőket: az állatok ketrecenkénti száma (vagy számának változása), az alom anyaga, környezeti hőmérséklet és relatív páratartalom, a megvilágítás időtartama, valamint a takarmány meghatározása.

▼M4

— A vizsgált faj/törzs, valamint a patkánytól eltérő faj alkalmazásának indokolása. Forrás- és múltbéli adatok is megadhatók, amennyiben azok hasonló expozíciós, tartási és koplaltatási körülmények között kitett állatokra vonatkoznak.

— Az állatok száma, kora és neme.

— A véletlen kiválasztás módszere.

— A vizsgálat előtti esetleges kondicionálás leírása, beleértve a takarmányt, a karantént és a betegség kezelését.

Vizsgált vegyi anyag

— Fizikai jelleg, tisztaság, valamint – ha lényeges – fizikai és kémiai tulajdonságok (beleértve az izomerizációt).

— Azonosító adatok és – amennyiben ismert – a Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám).

Vivőanyag

— A vivőanyag használatának, valamint kiválasztásának indokolása (ha a vivőanyag nem víz).

— Múltbeli vagy párhuzamosan kapott adatok, amelyek igazolják, hogy a vivőanyag nem befolyásolja a vizsgálat eredményét.

Inhalációs kamra

— Az inhalációs kamra részletes leírása, beleértve annak térfogatát és vázlatrajzát.

— Az állatok expozíciójához és a légkör előállításához használt berendezések eredete és leírása.

— A hőmérséklet, páratartalom, részecskeméret és tényleges koncentráció mérésére szolgáló berendezések.

— A levegő forrása és a kondicionáló rendszer.

— Az eszközök homogén vizsgálati légkör biztosítása érdekében történő kalibrálására alkalmazott módszerek.

— Nyomáskülönbség (pozitív vagy negatív).

— Expozíciós nyílások száma kamránként (csak orron keresztüli expozíció), az állatok helye a kamrában (egész testfelületen keresztüli expozíció).

— A vizsgálati légkör stabilitása.

— A hőmérséklet- és páratartalom-érzékelők, valamint a vizsgálati légkör mintavételének helye a kamrában.

— A bevitt/elszívott levegő kezelése.

— Légáramlási sebességek, légáramlási sebesség expozíciós nyílásonként (csak orron keresztüli expozíció), vagy az állatok terhelése kamránként (egész testfelületen keresztüli expozíció).

— Az inhalációs kamra egyensúlyi állapotának eléréséhez szükséges idő (t95).

— A térfogatváltozások óránkénti száma.

— Mérőberendezések (ha vannak).

Expozíciós adatok

— A fő vizsgálathoz kiválasztott célkoncentráció indokolása.

▼M4

— Névleges koncentrációk (az inhalációs kamrába való bejuttatásra előállított vizsgált vegyi anyag össztömege osztva a kamrán áthaladt levegő térfogatával).

— A vizsgált vegyi anyagnak az állatok belégzési zónájából gyűjtött tényleges koncentrációi; a heterogén halmazállapotokat (gáz, gőz, aeroszol) felvevő keverékek esetén mindegyik külön elemezhető.

— Minden levegőbeli koncentrációt tömegegységekben (mg/l, mg/m^3 stb.), nem pedig térfogategységekben (ppm, ppb stb.) kell megadni.

— Részecskeméret-eloszlás, tömegfelező aerodinamikai átmérő (MMAD), valamint geometriai szórás (σ_g), beleértve azok kiszámításának módját. Jegyzőkönyvezni kell az egyes részecskeméret-elemzéseket.

Vizsgálati körülmények

— A vizsgált vegyi anyag előkészítésének részletei, beleértve a szilárd anyagok részecskeméretének csökkentésére vagy a vizsgált vegyi anyag oldatainak elkészítésére esetlegesen alkalmazott eljárások részleteit.

— A vizsgálati légkör előállítására és az állatok vizsgálati légkörnek való kitételére alkalmazott berendezések leírása (lehetőség szerint vázlatrajzzal).

— A kamrabeli hőmérséklet, páratartalom és légáramlás (azaz a kalibrációs görbe kialakulásának) megfigyelésére használt berendezések részletei.

— A kamrabeli koncentráció és részecskeméret-eloszlás meghatározásához alkalmazott minták gyűjtésére használt berendezések részletei.

— Az alkalmazott kémiai analitikai módszer és a módszer validációjának részletei (beleértve a vizsgált vegyi anyag mintavételi közegből való visszanyerésének hatásfokát).

— Az állatok vizsgálati és kontrollcsoportokba való besorolásához alkalmazott véletlen kiválasztási módszer.

— A táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány típusa/eredete, a víz eredete).

— A vizsgált koncentrációk kiválasztásának indokolása.

Eredmények

— A kamrabeli hőmérséklet, páratartalom és légáramlás táblázatos összefoglalása.

— A kamrabeli névleges és tényleges koncentráció adatainak táblázatos összefoglalása.

— Részecskeméret-adatok táblázatos összefoglalása, beleértve az analitikai mintavételi adatokat, a részecskeméret-eloszlást, valamint az MMAD és a σ_g számításait.

— A válaszadatok és a koncentrációszintek táblázatos összefoglalása minden egyes állatra vonatkozóan (azaz a mérgezési tüneteket mutató és köztük az elhullt állatok, a hatások jellege, súlyossága, megjelenésének időpontja és időtartama).

▼M4

— Az egyes állatok súlyának táblázatos összefoglalása.

— A táplálékfelvétel táblázatos összefoglalása.

— A klinikai patológiai adatok táblázatos összefoglalása.

— A boncolások és adott esetben a kórszövettani vizsgálatok eredményei minden egyes állatra vonatkozóan.

Az eredmények szöveges értékelése és értelmezése

— Különös hangsúlyt kell fektetni az e vizsgálati módszer feltételeinek – például a határkoncentrációnak vagy a részecskeméretnek – való megfelelés érdekében alkalmazott módszerek leírására.

— Ki kell térni a részecskék belélegezhetőségére az általános megállapítások tükrében, különösen ha a részecskeméretre vonatkozó feltétel nem teljesült.

— A vizsgálat általános értékelésének ismertetnie kell a névleges és a tényleges koncentrációk meghatározására használt módszerek konzisztenciáját, valamint a tényleges és a névleges koncentráció közötti összefüggést.

— Ki kell térni az elhullás valószínű okára, valamint az elsődleges hatásmechanizmusra (szisztémás vagy helyi).

— Magyarázatot kell szolgáltatni, amennyiben a humánus végpontokról szóló OECD-iránymutatás (3) szerinti kritériumok alapján humánus módon el kellett pusztítani a fájdalommal küszködő vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutató állatokat.

— Meg kell jelölni a célszerve(ke)t.

— Meg kell határozni a NOAEL és a LOAEL értékét.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing,* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan.E and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material,* Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appéldául Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Az Európai Parlament és a Tanács 2008. december 16-i 1272/2008/EK rendelete az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról, HL L 353., 2008.12.31., 1. o.

▼**M4**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁS

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼M4

B.30. KRÓNIKUS TOXICITÁSI VIZSGÁLATOK

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 452. vizsgálati iránymutatásában (2009) leírt módszerrel. Az eredeti 452. vizsgálati iránymutatást 1981-ben fogadták el. A jelen felülvizsgált B.30. vizsgálati módszer kidolgozását az állatjóllét és a szabályozási követelmények terén az elmúlt időszakban bekövetkezett változások figyelembevétele érdekében tartották szükségesnek (1) (2) (3) (4). E B.30. vizsgálati módszer frissítése e melléklet B.32., A rákkeltő hatás vizsgálata című és B.33., A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata című fejezetének felülvizsgálatával párhuzamosan történt meg a vizsgálatban alkalmazott állatokra vonatkozó további információk megszerzése, valamint a dózis kiválasztásával kapcsolatos további részletek biztosítása céljából. A jelen vizsgálati módszer vegyi anyagok széles skálájának vizsgálatára szolgál, beleértve a növényvédő szereket és az ipari vegyszereket.

2. A krónikus toxicitási vizsgálatok többségét rágcsálófajokon végzik, ezért a jelen vizsgálati módszer elsősorban az e fajokon végzett vizsgálatokra alkalmazandó. Amennyiben az ilyen vizsgálatokat rágcsálóktól eltérő fajokon kell elvégezni, a megfelelő módosításokkal a jelen vizsgálati módszerben vázolt elvek és eljárások is alkalmazhatók, az e melléklet B.27., 90 napos, ismételt adagolású orális toxicitási vizsgálat nem rágcsálókon című fejezetében (5) vázoltakkal együtt, a krónikus toxicitási vizsgálatok és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok tervezésére és elvégzésére vonatkozó 116. OECD-iránymutatásban leírtak szerint (6).

3. A krónikus toxicitási vizsgálatok során alkalmazott három fő beadási mód az orális, a dermális és az inhalációs. A beadási mód kiválasztása függ a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, valamint az emberi expozíció jellemző módjától. Az expozíciós mód kiválasztására vonatkozó további információk a 116. OECD-iránymutatásban találhatók (6).

4. A jelen vizsgálati módszer az orális expozíciós módra összpontosít, amely a krónikus toxicitási vizsgálatok során a leggyakrabban alkalmazott mód. Az emberi egészségre jelentett kockázat értékeléséhez és/vagy bizonyos szabályozási rendszerek előírásai alapján dermális vagy inhalációs expozíciót alkalmazó, hosszú távú krónikus toxicitási vizsgálatok elvégzésére is szükség lehet ugyan, azonban technikai szempontból e két expozíciós mód mindegyike igen összetett. Az ilyen vizsgálatokat eseti alapon kell megtervezni, bár az itt ismertetett, a krónikus toxicitás orális beadás útján történő meghatározására és értékelésére szolgáló vizsgálati módszer a kezelési időszakokra, klinikai és patológiai paraméterekre stb. vonatkozó ajánlások tekintetében alapul szolgálhat az inhalációs és/vagy dermális vizsgálatokra vonatkozó protokollhoz. A vizsgált vegyi anyagok inhalációs (6) (7) és dermális (6) módon történő beadásával kapcsolatban OECD-iránymutatások állnak rendelkezésre. E melléklet B.8. (8) és B.29. fejezetét (9), valamint az akut inhalációs vizsgálatra vonatkozó OECD-iránymutatást (7) kifejezetten alkalmazni kell az inhalációs expozíciót alkalmazó, hosszabb távú vizsgálatok tervezése során. A dermális beadással végzett vizsgálatok esetében e melléklet B.9. fejezetét (10) kell alkalmazni.

▼M4

5. A krónikus toxicitási vizsgálat információt szolgáltat az ismételt, a vizsgált faj élettartamának jelentős részére kiterjedő expozícióból valószínűsíthetően fakadó egészségügyi kockázatokról. A vizsgálat információkkal szolgál a vizsgált vegyi anyag toxikus hatásairól, jelzi a célszerveket és a felhalmozódás lehetőségét. Becslést adhat továbbá az észlelhető káros hatással nem járó szintre is, amely felhasználható az emberi expozícióra vonatkozó biztonsági kritériumok meghatározásához. Hangsúlyos szerepet kap az állatok lehető legtöbb információ megszerzése érdekében történő körültekintő klinikai vizsgálatának szükségessége is.

6. A jelen vizsgálati módszerben ismertetett vizsgálatok célkitűzései többek között a következők:

— a vizsgált vegyi anyag krónikus toxicitásának meghatározása,

— a célszervek meghatározása,

— a dózis-válasz összefüggés jellemzőinek meghatározása,

— a nem észlelhető káros hatás szintjének (NOAEL) vagy a benchmark-dózis (BMD) meghatározásához szükséges kiindulópontnak a meghatározása,

— a krónikus toxicitás hatásainak előrejelzése az emberi expozíciós szintek vonatkozásában,

— a hatásmechanizmusra vonatkozó hipotézisek vizsgálatához szükséges adatok biztosítása (6).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

7. A vizsgált vegyi anyag toxikológiai jellemzőinek vizsgálata és értékelése során a vizsgálati laboratóriumnak a vizsgált vegyi anyagra vonatkozó összes rendelkezésre álló információt figyelembe kell vennie a vizsgálat megkezdését megelőzően annak érdekében, hogy a vizsgálati terv a vizsgált vegyi anyag lehetséges krónikus toxicitásának hatékonyabb vizsgálatára összpontosítson, valamint hogy az állatkísérleteket minimálisra csökkentsük. A vizsgálat megtervezését segítő információk többek között a vizsgált vegyi anyag azonossága, kémiai szerkezete, valamint fizikai és kémiai tulajdonságai, a hatásmechanizmusra vonatkozó bármely információ, bármely *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálat eredményei, a várható felhasználási terület(ek) és az emberi expozíció lehetősége, a szerkezetileg rokon vegyi anyagok rendelkezésre álló (Q)SAR- és toxikológiai adatai, a rendelkezésre álló toxikokinetikai adatok (egyszeri dózisra és adott esetben ismételt dózisra vonatkozó kinetikai adatok), valamint egyéb ismételt expozíciós vizsgálatokból származó adatok. A krónikus toxicitás meghatározása csak a toxicitásra vonatkozó, 28 napos vagy 90 napos ismételt dózisú toxicitási vizsgálatokból származó kezdeti információk megszerzését követően végzendő el. Az adott vizsgált vegyi anyag lehetséges egészségkárosító hatásai átfogó vizsgálatának részeként a krónikus toxicitás vizsgálatának fokozatos megközelítését kell megfontolni (11) (12) (13) (14).

8. Az eredmények elemzése szempontjából legmegfelelőbb statisztikai módszereket az adott kísérleti tervre és célkitűzésekre tekintettel a vizsgálat kezdetét megelőzően kell meghatározni. A megfontolandó kérdések közé tartozik, hogy tartalmazzanak-e a statisztikák a túléléssel kapcsolatos kiigazítást, valamint egy vagy több csoport idő előtti megszüntetése esetén végzett elemzést. A megfelelő statisztikai elemzésekre vonatkozó útmutatást, továbbá a nemzetközileg elfogadott statisztikai módszerekre vonatkozó főbb hivatkozásokat a 116. iránymutatás (6), valamint a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok elemzésével és értékelésével kapcsolatos 35. iránymutatás (15) tartalmazza.

▼M4

9. A krónikus toxicitási vizsgálatok elvégzése során a klinikai tünetek mint a biztonsági értékeléshez használt kísérleti állatok humánus végpontjai felismeréséről, értékeléséről és használatáról szóló 19. OECD-iránymutatásban (16), különösen annak 62. bekezdésében ismertetett vezérelveket és szempontokat minden esetben követni kell. E bekezdés szerint: „*Ha az ismételt adagolást alkalmazó vizsgálatok során egy állat progresszív, az állapot további romlásához vezető klinikai tüneteket mutat, tájékozott döntést kell hozni az állat humánus elpusztítására vonatkozóan. A döntéshozatal során mérlegelni kell az állat vizsgálatának folytatása révén szerezhető információk értékét az állat általános állapotához viszonyítva. Ha úgy döntünk, hogy az állatot továbbra is vizsgálni kell, a megfigyelések gyakoriságát szükség szerint növelni kell. Ha ez nem befolyásolja hátrányosan a vizsgálat céljának elérését, lehetséges az adagolás átmeneti szüneteltetése – ha ez csökkenti a fájdalmat vagy a szorongást – vagy a vizsgálati dózis csökkentése.*”

10. A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során alkalmazott dózisok kiválasztásnak elveire vonatkozó részletes útmutatás és ezen elvek leírása a 116. iránymutatásban (6), valamint a Nemzetközi Élettudományi Intézet két kiadványában található (17) (18). A fő dózis-kiválasztási stratégia a vizsgálat elsődleges célkitűzésétől vagy célkitűzéseitől függ (6. bekezdés). A megfelelő dózisszintek kiválasztásakor egyensúlyt kell találni egyfelől a veszélyesség vizsgálata, másfelől az alacsony dózisra adott válaszok jellemzése és azok relevanciája között. Ez különösen lényeges a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata (e melléklet B.33. fejezete) esetében (11. bekezdés).

11. Meg kell fontolni a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálatának elvégzését (e melléklet B.33. fejezete) a krónikus toxicitási vizsgálat (a jelen B.30. vizsgálati módszer) és a rákkeltő hatás vizsgálatának (e melléklet B.32. fejezete) külön-külön történő elvégzése helyett. A két külön vizsgálat elvégzéséhez viszonyítva az együttes vizsgálat idő- és költséghatékonyabb anélkül, hogy befolyásolná az adatok minőségét a krónikus fázisban vagy a karcinogenitási fázisban. A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata során (e melléklet B.33. fejezete) azonban körültekintően figyelembe kell venni a dóziskiválasztás elveit (9. és 20–25. bekezdés), továbbá azt is meg kell jegyezni, hogy bizonyos szabályozási keretrendszerek a vizsgálatok külön-külön történő elvégzését írhatják elő.

12. A jelen vizsgálati módszer összefüggésében használt fogalmak meghatározása a jelen fejezet végén és a 116. iránymutatásban található (6).

A VIZSGÁLAT ELVE

13. A vizsgált vegyi anyagot naponta adjuk be fokozatos dózisokban a kísérleti állatok több csoportjának, általában 12 hónapig, bár hosszabb és rövidebb időtartam is választható a szabályozási követelményektől függően (lásd a 33. bekezdést). A kiválasztott időtartamnak elég hosszúnak kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye a kumulatív toxicitás esetleges hatásainak megjelenését a geriátriai változások zavaró hatásai nélkül. A 12 hónapos expozíciós időtartamtól való eltérést indokolni kell, különösen a rövidebb időtartamok esetében. A vizsgált vegyi anyagot általában orális úton juttatjuk be, azonban az inhalációs vagy dermális bejuttatással történő vizsgálat is megfelelő lehet. A vizsgálati terv egy vagy több időközi elpusztítást is tartalmazhat, például a 3. és a 6. hónapot követően, és állatok további csoportjai vonhatók be ennek kiegyenlítése érdekében (lásd a 19. bekezdést). Az anyag beadásának időszakában az állatokat a toxicitás jeleinek észlelése érdekében gondosan megfigyeljük. A vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított állatokat felboncoljuk, továbbá a vizsgálat befejezése után az életben maradt állatokat is elpusztítjuk és felboncoljuk

▼M4

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

14. A jelen vizsgálati módszer elsősorban a krónikus toxicitás rágcsálókban történő vizsgálatával és értékelésével foglalkozik (lásd a 2. bekezdést), ugyanakkor tudatában kell lenni annak, hogy bizonyos szabályozási rendszerek hasonló vizsgálatok nem rágcsálókon történő elvégzését írhatják elő. A faj kiválasztását indokolni kell. A rágcsálóktól eltérő fajokon végzett krónikus toxicitási vizsgálatok tervezésének és elvégzésének adott esetben a jelen vizsgálati módszerben ismertetett elveken, valamint az e melléklet B.27., 90 napos, ismételt adagolású orális toxicitási vizsgálat nem rágcsálókon című fejezetében (5) leírtakon kell alapulnia. A faj és törzs kiválasztására vonatkozó további információk a 116. iránymutatásban találhatók (6).

15. A jelen vizsgálati módszer szerint előnyben részesítendő rágcsálófaj a patkány, de más rágcsálófaj, például az egér is használható. A patkányok és az egerek a viszonylag rövid élettartamuk, gyógyszerészeti és toxikológiai vizsgálatokban elterjedt használatuk, a tumorindukcióra való fogékonyságuk, valamint a megfelelően jellemzett törzsek rendelkezésre állása miatt preferált kísérleti modellek. E tulajdonságok eredményeképpen nagy mennyiségű információ áll rendelkezésre fiziológiájukról és patológiájukról. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal, ivarérett állatokat kell alkalmazni. A krónikus toxicitás vizsgálatát olyan állatokon kell elvégezni, amelyek törzse és eredete megegyezik a rövidebb időtartamú előzetes toxicitási vizsgálat(ok)ban felhasznált állatokéval. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek.

Tartási és etetési körülmények

16. Az állatokat külön, vagy azonos nemű egyedekből álló kis csoportokban kell tartani; a külön történő tartást csak akkor kell fontolóra venni, ha az tudományos szempontból indokolt (19) (20) (21). A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezésének lehetséges hatásait. A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérséklete 22 °C (± 3 °C) kell, hogy legyen. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem szabad meghaladnia a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez hagyományos laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmánynak meg kell felelnie a vizsgált faj összes tápanyagigényének, és a vizsgálat eredményét esetlegesen befolyásoló takarmány-szennyeződések mennyiségének – beleértve többek között a növényvédőszer-maradványokat, a perzisztens szerves szennyező anyagokat, a fitoösztrogéneket, a nehézfémeket és a mikotoxinokat – a lehető legalacsonyabbnak kell lennie. A tápanyagokban és takarmányokban lévő szennyező anyagok szintjére vonatkozó analitikai információkat időszakos jelleggel kell meghatározni, legalább a vizsgálat kezdetekor, valamint amikor változás következik be a felhasznált adagban, és ezeket az információkat a zárójelentésben közölni kell. A vizsgálat során felhasznált ivóvízre vonatkozó analitikai információkat hasonló módon kell megadni. A vizsgált vegyi anyag táplálékkal történő beadása esetén a takarmány megválasztását befolyásolhatja annak szükségessége, hogy az megfelelően keveredjen el a takarmánnyal és kielégítse az állatok táplálkozási igényeit.

Az állatok előkészítése

17. A laboratóriumi körülményekhez legalább 7 napig szoktatott, egészséges állatokat kell használni, amelyek korábban nem voltak kitéve kísérleti eljárásoknak. Rágcsálók esetében az állatoknak történő adagolást az elválasztást és szoktatást követően a lehető leghamarabb, és lehetőleg az állatok 8 hetes kora előtt meg kell kezdeni. A kísérleti állatokat faj, törzs, eredet, nem, súly és életkor szerint kell jellemezni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya az

▼M4

egyes nemeken belül csak minimálisan térhet el egymástól, a vizsgálatban használt összes állat súlyának átlagos értékétől pedig legfeljebb ± 20 %-kal különbözhet mindkét nem esetében. Az állatokat véletlenszerűen kell besorolni a kontroll- és kezelt csoportokba. A véletlenszerű kiválasztást követően nem lehet lényeges különbség az egyes nemeken belül a csoportok átlagos testsúlya között. Ha statisztikailag szignifikáns különbségek fordulnak elő, a véletlenszerű kiválasztás lépését lehetőség szerint meg kell ismételni. Minden egyes állatnak egyedi azonosító számot kell kapnia, és minden egyes állatot maradandóan meg kell jelölni ezzel a számmal tetoválás, mikrochip-beültetés vagy más megfelelő módszer segítségével.

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

18. A vizsgálathoz mindkét nemet fel kell használni. Megfelelő számú állatot kell használni, hogy a vizsgálat végén mindegyik csoportban elegendő állat álljon rendelkezésre az alapos biológiai és statisztikai értékeléshez. Rágcsálók esetén az egyes dózisszintekhez általában nemenként és csoportonként legalább 20 állat, nem rágcsálók esetén pedig nemenként és csoportonként legalább 4 állat javasolt. Az egerekkel végzett vizsgálatok esetében további állatok bevonása lehet szükséges minden egyes dóziscsoportban az összes előírt hematológiai meghatározás elvégzése céljából.

Időközi elpusztításra, kísérő csoportokra és jelzőállatokra vonatkozó rendelkezések

19. Amennyiben ez tudományos szempontból indokolt, a vizsgálat a toxikológiai változások alakulására vonatkozó és mechanisztikai információk megszerzése céljából előírhatja az időközi elpusztítást (legalább 10 állat/nem/csoport esetén), például a 6. hónapban. Abban az esetben, ha ilyen információk a vizsgált vegyi anyaggal végzett korábbi, ismételt adagolású toxicitási vizsgálatokból már rendelkezésre állnak, az időközi elpusztítás tudományos szempontból nem feltétlenül indokolt. Kísérő csoportok is bevonhatók a vizsgált vegyi anyag által esetlegesen okozott toxikológiai változások visszafordíthatóságának megfigyelése céljából; ezek vizsgálata általában a vizsgálat legnagyobb dózisával való kezelésre és kontrollvizsgálatra korlátozódik. Szükség szerint egy jelzőállatokból álló további (jellemzően nemenként 5 állatból álló) csoport is bevonható a betegség állapotának a vizsgálat közben történő megfigyelése céljából (22). Ha időközi elpusztítás vagy kísérő, illetve jelzőcsoportok alkalmazását tervezzük, az állatok vizsgálati tervben szereplő létszámát annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el szándékozunk pusztítani. Ezeket az állatokat általában ugyanazoknak a megfigyeléseknek kell alávetni, mint a fő vizsgálat krónikus toxicitási fázisában vizsgált állatokat, beleértve a testsúlyra, táplálék-/vízfogyasztásra, hematológiára és klinikai kémiára vonatkozó méréseket, valamint patológiai vizsgálatokat, de előírható (az időközi elpusztítás céljából bevont csoportoknál), hogy a mérések csak bizonyos főbb paraméterekre, például a neurotoxicitásra vagy az immuntoxicitásra korlátozódjanak.

Dóziscsoportok és adagolás

20. A dózis kiválasztásának és a dózisszintek felosztásának összes szempontjára vonatkozó útmutatás a 116. iránymutatásban (6) található. Legalább három dózisszintet és egy ezzel párhuzamos kontrollt kell alkalmazni, kivéve, ha határérték-vizsgálatot végzünk (lásd a 27. bekezdést). A dózisszintek megválasztása általában a rövidebb távú ismételt adagolású vagy tartománybehatároló vizsgálatok eredményein alapul, figyelembe véve a vizsgált vegyi anyagra vagy rokon vegyi anyagokra vonatkozóan rendelkezésre álló bármilyen toxikológiai és toxikokinetikai adatot.

▼**M4**

21. Ha a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai jellege vagy biológiai hatásai nem szabnak ennek korlátot, a legmagasabb dózisszintet általában olyan módon kell kiválasztani, hogy az alkalmas legyen az elsődleges célszervek és toxikus hatások meghatározására, ugyanakkor elkerülhető legyen a szenvedés, a súlyos toxicitás, a morbiditás vagy az elhullás. A 22. bekezdésben bemutatott tényezők figyelembevétele mellett a legmagasabb dózisszintet úgy kell megválasztani, hogy toxicitást váltson ki, amely például a testsúly növekedésének (körülbelül 10 %-os) visszaesésével bizonyítható.

22. A vizsgálat célkitűzéseitől függően azonban (lásd a 6. bekezdést) a toxicitást bizonyíthatóan kiváltó dózisnál alacsonyabb maximális dózis is választható, például ha egy dózis káros hatást idéz elő, amely azonban csak kismértékben befolyásolja az élettartamot vagy a testsúlyt. A maximális dózis nem haladhatja meg az 1 000 mg/testsúlykilogramm/nap értéket (határdózis, lásd a 27. bekezdést).

23. A dózisszintek és azok felosztása megválasztható úgy, hogy meghatározható legyen a dózis-válasz összefüggés és a NOAEL, vagy a vizsgálat egyéb tervezett kimenetele, például a legalacsonyabb dózisszinten megfigyelhető BMD (lásd a 25. bekezdést). Az alacsonyabb dózis kiválasztása során figyelembe veendő tényezők többek között a dózis-válasz görbe várható meredeksége, azok a dózisok, amelyeknél fontos változások következhetnek be a metabolizmusban vagy a toxikus hatás mechanizmusában, amelyeknél küszöbérték várható, vagy amelyeknél az alacsony dózis extrapolálásához használható kiindulási pont várható.

24. A dózisszintek felosztásának kiválasztása függ a vizsgált vegyi anyag jellemzőitől, és nem írható elő a jelen vizsgálati módszerben, ugyanakkor csökkenő dózisszintek meghatározásához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása, az adagolások közötti nagyon nagy intervallumok (például körülbelül 6–10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazásával szemben pedig gyakran előnyben részesítendő egy negyedik vizsgálati csoport beiktatása. A 10-nél magasabb szorzófaktorokat általában kerülni kell, és használatukat meg kell indokolni.

25. A 116. iránymutatásban (6) részletesebben leírtak szerint a dózis kiválasztásakor figyelembe veendő szempontok többek között a következők:

— ismert vagy feltételezett nemlinearitások vagy elhajlási pontok a dózis-válasz görbén,

— toxikokinetika, valamint azok a dózistartományok, amelyek esetében a metabolikus indukció, a telítettség vagy a külső és belső dózisok közötti nemlinearitás előfordul, vagy nem fordul elő,

— prekurzor elváltozások, hatásmarkerek vagy a főbb mögöttes biológiai folyamatok működésének mutatói,

— A hatásmechanizmus főbb (vagy feltételezett) aspektusai, például azok a dózisok, amelyeknél megjelenik a citotoxicitás, felborulnak a hormonszintek és a homeoszatikus mechanizmusok stb.,

— A dózis-válasz görbe azon területei, ahol különösen pontos becslés szükséges, például a várt BMD vagy egy feltételezett küszöbérték tartományában,

— a várható humán expozíciós szintek figyelembevétele.

▼M4

26. Kontrollcsoportként egy kezeletlen csoport, vagy ha a vizsgált vegyi anyag beadásához vivőanyagot használunk, egy vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport alkalmazandó. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgált vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Vivőanyag alkalmazása esetén a kontrollcsoportban a vivőanyagot a dóziscsoportokban alkalmazott legnagyobb mennyiségben kell beadni. Ha a vizsgált vegyi anyagot a táplálékkal adjuk be, és emiatt a táplálékfogyasztás a táplálék lecsökkent ízletessége miatt jelentősen csökken, hasznos lehet egy párban etetett kontrollcsoport alkalmazása a megfelelőbb kontroll biztosítása érdekében.

27. Ha előzetes vizsgálatokból származó információk alapján előre jelezhető, hogy az egyetlen, legalább 1 000 mg/testsúlykilogramm/nap dózisnak megfelelő dózisszinttel, az e vizsgálathoz leírt eljárásokat követve végzett vizsgálat valószínűleg nem okoz kedvezőtlen hatásokat, valamint a szerkezetileg rokon vegyi anyagokra vonatkozó adatok alapján nem várható a toxicitás bekövetkezése, akkor a teljes, három adagolási szintet átfogó vizsgálat elvégzése nem feltétlenül szükséges. 1 000 mg/testsúlykilogramm/nap határadag alkalmazható, kivéve, ha a humán expozíció magasabb dózisszint használatát indokolja.

A dózisok előkészítése és a vizsgált vegyi anyag beadása

28. A vizsgált vegyi anyagot általában orálisan, a takarmánnyal vagy az ivóvízzel, vagy gyomorszonda segítségével adjuk be. A bejuttatás útvonalára és módjára vonatkozó további információk a 116. iránymutatásban találhatók (6). A bejuttatás útvonala és módja függ a vizsgálat céljától, a vizsgált vegyi anyag fizikai/kémiai tulajdonságaitól, biológiai hozzáférhetőségétől, valamint az emberi expozíció meghatározó útvonalától és módjától. A bejuttatás útvonalának és módjának kiválasztását indokolni kell. Állatjóléti okokból gyomorszonda rendszerint csak olyan hatóanyagoknál alkalmazandó, amelyek esetében a bejuttatásnak ez az útvonala és módja ésszerűen tükrözi a lehetséges humán expozíciót (például gyógyszerek esetében). A táplálékban vagy környezetben előforduló vegyi anyagok, többek között a növényvédő szerek esetében a beadás jellemzően a táplálékon vagy az ivóvízen keresztül történik. Néhány forgatókönyv, például a munkahelyi expozíció esetében ugyanakkor a beadás egyéb útvonalai megfelelőbbnek bizonyulhatnak.

29. A vizsgált vegyi anyagot szükség esetén feloldjuk vagy szuszpendáljuk alkalmas vivőanyagban. Adott esetben figyelembe kell venni a vivőanyag és más adalékanyagok következő tulajdonságait: a vizsgált vegyi anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára vagy visszamaradására gyakorolt hatások, a vizsgált vegyi anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt azon hatások, amelyek módosíthatják annak toxikus jellemzőit, valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások. Lehetőség szerint elsősorban vizes oldatot/szuszpenziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (például kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. A vizsgált vegyi anyag beadási körülmények közötti (például takarmánnyal történő beadás során fennálló) stabilitására és (adott esetben) a beadáshoz használt oldatok vagy takarmányok homogenitására vonatkozó információknak rendelkezésre kell állniuk.

30. A takarmánnyal vagy ivóvízzel adagolt vegyi anyagok esetében fontos biztosítani, hogy a vizsgált vegyi anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt vagy a vízháztartás egyensúlyát. A takarmánnyal történő beadást alkalmazó hosszú távú toxicitási vizsgálatok esetében a takarmányban lévő vizsgált vegyi anyag koncentrációja a kiegyensúlyozatlan táplálkozás elkerülése érdekében általában nem haladhatja meg a teljes takarmány 5 %-át. Ha a vizsgált vegyi anyagot a takarmányba keverve adjuk be, akkor vagy állandó takarmánykoncentráció (mg/takarmánykilogramm vagy ppm), vagy az állatok testsúlyára heti rendszerességgel kiszámított állandó dózisszint (mg/testsúlykilogramm) alkalmazható. A kiválasztott alternatívát meg kell nevezni.

▼M4

31. Orális úton történő beadás esetén a vizsgált vegyi anyagot naponta kell az állatoknak beadni (heti hét napon keresztül) általában 12 hónapon át (lásd még a 33. bekezdést), bár a szabályozási követelményektől függően hosszabb időtartam is szükséges lehet. Bármely más adagolási rendszer – például heti öt napon történő beadás – használatát indokolni kell. Dermális úton történő beadás esetén az állatokat az e melléklet B.9. fejezetében (10) meghatározottak szerint általában legalább napi 6 órán keresztül, heti 7 napon kell a vizsgált vegyi anyaggal kezelni 12 hónapon át. Az inhaláció útján történő expozíciót napi 6 órán keresztül, heti 7 nap kell elvégezni, de indokolt esetben heti 5 napos expozíció is alkalmazható. Az expozíció időtartama általában 12 hónap. Patkányoktól eltérő rágcsálófajok csak orron át történő expozíciója esetén az expozíció maximális időtartama kiigazítható a fajspecifikus szorongás minimalizálása érdekében. A napi 6 óránál rövidebb expozíciós időtartam alkalmazását indokolni kell. Lásd még e melléklet B.8. fejezetét (8).

32. Ha a vizsgált vegyi anyagot szondán át adagoljuk, a dózist mindig a nap hasonló időszakában, gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át kell beadni az állatoknak. Általában egyetlen dózist kell beadni naponta egyszer; abban az esetben, ha a vegyi anyag például helyi irritációt okoz, a napi dózisarány fenntartható lehet elosztott (napi kétszeri) beadással. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. A mennyiséget a lehető legalacsonyabb szinten kell tartani, és rágcsálók esetében általában nem haladhatja meg az 1 ml/100 testsúlygramm térfogatot (22). A koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi dózisszinten konstans mennyiséget lehessen adagolni. A fentiek alól kivételt jelentenek az esetlegesen maró vagy irritatív hatást kiváltó anyagok, amelyeket hígítani kell a súlyos helyi hatások elkerülése érdekében. Kerülni kell az emésztőrendszerben valószínűsíthetően maró vagy irritatív hatást kiváltó koncentrációkkal történő vizsgálatokat.

A vizsgálat időtartama

33. A jelen vizsgálati módszert ugyan elsődlegesen 12 hónapos krónikus toxicitási vizsgálatként dolgozták ki, a vizsgálati terv azonban az adott szabályozási rendszer követelményeitől vagy bizonyos mechanisztikai céloktól függően lehetővé teszi a rövidebb (például 6 vagy 9 hónapos) vagy hosszabb (például 18 vagy 24 hónapos) időtartamú vizsgálatokat, illetve alkalmazható ilyen időtartamú vizsgálatok során is. A 12 hónapos expozíciós időtartamtól való eltérést indokolni kell, különösen a rövidebb időtartamok esetében. A vizsgált vegyi anyag által esetlegesen okozott toxikológiai változások visszafordíthatóságának megfigyelése céljából bevont kísérő csoportokat az expozíció megszüntetését követően legalább 4 hétig, de legfeljebb a vizsgálat teljes időtartamának egyharmadáig fenn kell tartani adagolás nélkül. További, többek között a vizsgálat során életben maradt állatok figyelembevételével kapcsolatos útmutatás a 116. iránymutatásban (6) található.

MEGFIGYELÉSEK

34. Rendszerint a nap elején és végén – beleértve a hétvégéket és az ünnepnapokat is – az összes állatot meg kell vizsgálni, hogy nem mutatja-e megbetegedés jeleit vagy nem hullott-e el. Általános klinikai megfigyelést naponta legalább egyszer kell végezni, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban, szondával történő adagolás esetén figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát.

▼M4

35. Az első expozíció előtt legalább egyszer (az egyedek közötti összehasonlítás érdekében), a vizsgálat első hetének végén, azt követően pedig havonta egyszer az összes állatot részletes klinikai megfigyeléseknek kell alávetni. A megfigyelési protokollt úgy kell kialakítani, hogy az egyes megfigyelők közötti különbségek minimálisak legyenek, és függetlenek legyenek a vizsgált csoportoktól. E megfigyeléseket az állatok tartására egyébként használt ketreceken kívül, lehetőleg egy szabványos karámban, minden alkalommal a nap hasonló időszakában kell elvégezni. A megfigyeléseket gondosan fel kell jegyezni, lehetőleg a vizsgálatokat végző laboratórium által kifejezetten meghatározott pontozásos rendszer segítségével. Törekedni kell arra, hogy a megfigyelési körülmények közötti különbségek minimálisak legyenek. A feljegyzett észleléseknek ki kell terjedniük többek között a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapota, a váladékok és kiválasztott anyagok előfordulása, valamint az autonóm aktivitás (például könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupillaméret, valamint szokatlan légzési ritmusok) tekintetében megfigyelhető változásokra. A járás, a testtartás és a kézbevételre adott reakció megváltozását, valamint a klónusos vagy tónusos görcsök, sztereotip viselkedés (például túlzott mosdás, megkergülés) vagy bármilyen bizarr viselkedésmód (például öncsonkítás, hátrafelé járás) megfigyelt eseteit is fel kell jegyezni (24).

36. A vizsgált vegyi anyag első beadását szemtükörrel vagy más, megfelelő eszközzel végzett szemészeti vizsgálat előzi meg, amelyet az összes állaton el kell végezni. E vizsgálatot a vizsgálatsorozat végén meg kell ismételni, lehetőleg az összes állaton, de legalább a magas dózissal kezelt és kontrollcsoportok tagjain. Ha a szemben a kezeléssel összefüggő elváltozást tapasztalunk, az összes állatot meg kell vizsgálni. Ha szerkezeti elemzés vagy egyéb információ szemtoxicitásra utal, a szemvizsgálatot gyakrabban kell elvégezni.

37. Az olyan vegyi anyagok esetében, amelyeknél a korábbi, ismételt adagolású, 28 napos és/vagy 90 napos toxicitási vizsgálatok lehetséges neurotoxikus hatásokat jeleztek, a vizsgálat megkezdését megelőzően, valamint a vizsgálat kezdetét követő 12. hónap végéig 3 hónapos időközönként, továbbá a vizsgálat végén (ha az tovább tart 12 hónapnál) elvégezhető a különböző típusú ingerekre (24) (például hallószervi, vizuális, önérzékelési ingerek) mutatott érzékszervi reakciók vizsgálata (25), (26), (27), a szorítás erejének értékelése (28) és a motoros aktivitás felmérése (29). A követendő eljárásokkal kapcsolatban további részletek a vonatkozó szakirodalomban találhatók. Ettől függetlenül a hivatkozottaktól eltérő alternatív eljárások is alkalmazhatók.

38. Az olyan vegyi anyagok esetében, amelyeknél a korábbi, ismételt adagolású, 28 napos és/vagy 90 napos toxicitási vizsgálatok lehetséges immuntoxikus hatásokat jeleztek, e végpont további vizsgálatát lehet végezni a vizsgálat végén.

Testsúly, táplálék-/vízfogyasztás és táplálékhasznosítási képesség

39. A kezelés kezdetekor, az első 13 hét során legalább hetente egyszer, ezután pedig legalább havonta egyszer meg kell mérni az összes állat testsúlyát. A táplálékfogyasztást és a táplálékhasznosítási képességet a vizsgálat első 13 hetében legalább hetente, azt követően pedig legalább havonta egyszer kell mérni. Ha a vizsgált vegyi anyagot ivóvízzel adjuk be, a vízfogyasztást a vizsgálat első 13 hetében legalább hetente, azt követően pedig legalább havonta egyszer kell mérni. A vízfogyasztás mérését olyan vizsgálatok esetében is fontolóra kell venni, amelyek során az ivási szokások megváltoznak.

▼M4

Hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatok

40. A rágcsálókon végzett vizsgálatok esetében csoportonként legalább 10 hím és 10 nőstény állaton hematológiai vizsgálatokat kell végezni a 3., 6. és 12. hónapban, valamint a vizsgálat végén (ha az hosszabb, mint 12 hónap), mindegyikhez ugyanazokat az állatokat használva. Az egereken végzett vizsgálatok esetében kísérő csoportra lehet szükség az összes előírt hematológiai vizsgálat elvégzése céljából (lásd a 18. bekezdést). A nem rágcsálókon végzett vizsgálatok esetében kisebb számú (kutyákon végzett kísérleteknél például nemenként 4) állattól kell mintát venni köztes mintavételi időpontokban, valamint a vizsgálat végén, a rágcsálók esetében leírtak szerint. Ha a korábbi, hasonló dózisszintekkel elvégzett 90 napos vizsgálatok nem mutattak változást a hematológiai paraméterek vonatkozásában, a vizsgálat 3. hónapjában nem szükséges méréseket végezni, rágcsálók és egyéb fajok esetében sem. Vérmintákat meghatározott helyről kell venni, például a szívből vagy a szemgolyó mögötti üregből altatás alatt.

41. Az alábbi paramétereket kell vizsgálni (30): teljes és differenciált leukocitaszám, eritrocitaszám, trombocitaszám, hemoglobinkoncentráció, hematokrit (vérsejtsüllyedés), átlagos sejttérfogat (MCV), eritrociták átlagos hemoglobintartalma (MCH), eritrociták átlagos hemoglobinkoncentrációja (MCHC), prothrombin idő, valamint aktivált parciális tromboplasztin idő. A vizsgált vegyi anyag toxicitásától függően szükség szerint egyéb hematológiai paramétereket, például Heinz-testeket vagy egyéb atipikus eritrocitamorfológiát vagy methemoglobint is lehet mérni. Általánosságban elmondható, hogy rugalmas megközelítés alkalmazandó, amely az adott vizsgált vegyi anyag megfigyelt és/vagy várható hatásaitól egyaránt függ. Ha a vizsgált vegyi anyag a vérképző rendszerre hat, a retikulocitaszám és a csontvelőcitológia is feltüntethető, habár ezek vizsgálatát nem szükséges rutinszerűen elvégezni.

42. A szövetekben jelentkező fontosabb toxikus hatások és különösen a vesékre és a májra gyakorolt hatás vizsgálata érdekében a klinikai biokémiai értékek meghatározását legalább 10 hím és 10 nőstény állattól vett vérmintákból kell elvégezni a hematológiai vizsgálatokhoz meghatározott időközönként, minden esetben ugyanazokat az állatokat használva. Az egereken végzett vizsgálatok esetében kísérő csoportra lehet szükség az összes előírt klinikai biokémiai vizsgálat elvégzése céljából. A nem rágcsálókon végzett vizsgálatok esetében kisebb számú (kutyákon végzett kísérleteknél például nemenként 4) állattól kell mintát venni köztes mintavételi időpontokban, valamint a vizsgálat végén, a rágcsálók esetében leírtak szerint. Ha a korábbi, hasonló dózisszintekkel elvégzett 90 napos vizsgálatok nem mutattak változást a klinikai biokémiai paraméterek vonatkozásában, a vizsgálat 3. hónapjában nem szükséges méréseket végezni, rágcsálók és egyéb fajok esetében sem. A vérvétel előtti éjszaka javasolt az állatokat koplaltatni (kivéve egerek esetében). A következő paramétereket kell vizsgálni (30): glükóz, karbamid (karbamid-nitrogén), kreatinin, teljes fehérje, albumin, kalcium, nátrium, kálium, teljes koleszterin, legalább két értékelhető minta a májsejtek értékeléséhez (alanin-aminotranszferáz, aszpartát-aminotranszferáz, glutamát-dehidrogenáz, teljes epesav) (31), valamint legalább két értékelhető minta a máj és az eperendszer értékeléséhez (alkáli foszfatáz, gamma-glutamil-transzpeptidáz, 5'-nukleotidáz, teljes bilirubin, teljes epesav) (31). A vizsgált vegyi anyag toxicitásától függően szükség szerint más klinikai kémiai paraméterek, például az éhgyomorra mért trigliceridek, bizonyos hormonok és a kolinészterázszint mérése is elvégezhető. Általánosságban elmondható, hogy rugalmas megközelítés alkalmazandó, amely az adott vizsgált vegyi anyag megfigyelt és/vagy várható hatásaitól egyaránt függ.

▼M4

43. Vizeletelemzést legalább 10 hím és 10 nőstény állaton kell végezni a hematológiai és klinikai kémiai vizsgálatokhoz meghatározott időközönként levett mintákon. Ha a korábbi, hasonló dózisszintekkel elvégzett 90 napos vizsgálatok nem mutattak változást a vizeletelemzés vonatkozásában, a vizsgálat 3. hónapjában nem szükséges méréseket végezni. A klinikai patológiai vizsgálatra vonatkozó szakértői ajánlás a következő vizsgálandó paramétereket tartalmazza (30): küllem, mennyiség, ozmolalitás vagy fajsúly, pH-érték, összes fehérje, valamint glükóz. Az egyéb mérések közé tartozik a keton, az urobilinogén, a bilirubin és a vizeletben jelen lévő vér vizsgálata. Szükség szerint további paraméterek vizsgálatát is be lehet vezetni a megfigyelt hatás(ok) vizsgálati körének bővítése érdekében.

44. Általánosan elfogadott, hogy kutyákon végzett vizsgálatok esetében a kezelés előtt kiinduló hematológiai és klinikai biokémiai változókra van szükség, rágcsálók vizsgálatánál azonban ez nem szükséges (30). Ha azonban a rendelkezésre álló kiinduló adatok (lásd az 50. bekezdést) nem bizonyulnak elegendőnek, megfontolandó ezen adatok meghatározása.

Patológia

Autopszia

45. Általában a vizsgálatokba bevont összes állatot teljes körű, beható autopsziának kell alávetni, ideértve a következők alapos vizsgálatát: a test külső felszíne, az összes testnyílás, a koponya, a mellüreg, a hasüreg és ezek tartalma. Előírható ugyanakkor (az időközi elpusztítás céljából bevont vagy kísérő csoportoknál), hogy a mérések csak bizonyos főbb paraméterekre, például a neurotoxicitásra vagy immuntoxicitásra korlátozódjanak (lásd a 19. bekezdést). Ezeket az állatokat nem kell alávetni boncolásnak és az azt követő, a következő bekezdésekben ismertetett eljárásoknak. A jelzőállatok esetében a vizsgálatvezető döntésétől függően eseti alapú boncolásra lehet szükség.

46. A 45. bekezdés utóbbi részében kivételként megjelölt állatokéin kívül az összes állat szerveinek súlyát meg kell mérni. Az összes állat (eltekintve az elhullásközeli állapotban lévő és/vagy a vizsgálat befejeztét megelőzően elpusztított egyedektől) mellékveséit, agyát, mellékheréit, szívét, veséit, máját, petefészkeit, lépét, heréit, pajzsmirigyét (amelyet fixálás után mérünk meg a mellékpajzsmirigyekkel együtt) és méhét megfelelően meg kell tisztítani minden rátapadt szövettől, és azok nedves súlyát a boncolást követően a lehető legrövidebb időn belül meg kell mérni, mielőtt azok kiszáradnának. Egereken végzett vizsgálat esetén a mellékvese megmérése nem kötelező.

47. Az alábbi szöveteket a szövet típusa és a később elvégezni kívánt kórszövettani vizsgálat szempontjából legmegfelelőbb fixálóanyaggal kell tartósítani (32) (a szögletes zárójelben megadott szövetek megőrzése nem kötelező):

minden makroszkopikus elváltozás	szív	hasnyálmirigy	gyomor (előgyomor, mirigygyomor)
mellékvese	csípőbél	mellékpajzsmirigy	[fogazat]
aorta	éhbél	perifériás idegek	here
agy (beleértve a nagyagy, a kisagy és a nyúltvelő/nyúltagyi híd metszeteit)	vese	agyalapi mirigy	csecsemőmirigy
vakbél	könnymirigy (szemüregen kívüli)	prosztata	pajzsmirigy
méhnyak	máj	végbél	[nyelv]

▼M4

koaguláló mirigy	tüdő	nyálmirigy	légcső
vastagbél	nyirokcsomók (felszíni és mély)	ondóhólyag	húgyhólyag
patkóbél	emlőmirigy (nőstényeknél kötelező, hímeknél csak ha láthatóan kimetszhető)	harántcsíkolt izom	méh (beleértve a méhnyakat)
mellékhere	[felső légutak, beleértve az orrot, az orrkagylókat és az orrmelléküregeket]	bőr	[húgyvezeték]
szem (beleértve a retinát)	nyelőcső	gerincvelő (három szinten: nyaki, mellkasi középső és ágyéki szakasz)	[húgycső]
[combcsont az ízületi felülettel együtt]	[szaglógumó]	lép	hüvely
epehólyag (patkánytól eltérő fajoknál)	petefészek	[szegycsont]	metszet a csontvelőből és/vagy egy friss, csontvelőből felszívott minta
Harder-mirigy			

Páros szervek, például vesék, mellékvesék esetében mind a két szervet tartósítani kell. A klinikai és más jellegű megfigyelések alapján további testszövetek vizsgálata is szükséges lehet. A fentieken túl meg kell őrizni minden olyan más szervet is, amely a vizsgált vegyi anyag ismert tulajdonságai alapján valószínűleg célszervnek tekinthető. A dermális úton történő bejuttatást alkalmazó vizsgálatok esetében az orális módon történő beadásnál felsorolt szerveket kell tartósítani, továbbá elengedhetetlen a bőrből történő mintavétel a beadás helyéről és e minta tartósítása. Inhalációs vizsgálatok esetében a légzőrendszerből származó tartósított és vizsgált szövetek felsorolásának követnie kell az e melléklet B.8. (8) és B.29. fejezetében (9) tett ajánlásokat. Egyéb szervek/szövetek esetében (valamint a légzőrendszerből származó tartósított szöveteken túl) az orális úton történő beadásnál felsorolt szerveket kell vizsgálni.

Kórszövettani vizsgálatok

48. A toxikológiai patológiai vizsgálatok elvégzésének legjobb gyakorlatára vonatkozóan iránymutatás áll rendelkezésre (32). Legalább a következő szöveteket kell kórszövettani vizsgálatnak alávetni:

— a magas dózissal kezelt csoportból és a kontrollcsoportokból származó összes szövet,

— a vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított állatokból származó összes szövet,

— a makroszkopikus rendellenességeket mutató összes szövet,

— a célszöveteket, vagy azon szöveteket, amelyek a legnagyobb dózissal kezelt csoportnál a kezelésnek tulajdonítható elváltozásokat mutatnak, az összes többi dóziscsoport összes állatánál meg kell vizsgálni,

— páros szervek, például vesék, mellékvesék esetében mind a két szervet vizsgálni kell.

▼M4

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

49. Az összes értékelt paraméterre vonatkozó adatokat minden egyes állat esetében rögzíteni kell. Ezenfelül az összes adatot táblázat formájában összegezni kell, a vizsgált állatok minden csoportja tekintetében bemutatva, hogy hány egyeddel indult a vizsgálat, hány állat pusztult el, illetve hányat kellett elpusztítani humánus okokból a vizsgálat során, valamint az elpusztulás vagy humánus okokból való elpusztítás időpontját, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ideértve bármely toxikus hatás kezdetének idejét, időtartamát és súlyosságát, az elváltozásokat mutató állatok számát, az elváltozások típusát és az egyes elváltozástípusokat mutató állatok százalékos arányát. Az összegző adattáblázatoknak tartalmazniuk kell a toxikus hatásokat vagy elváltozásokat mutató állatokra vonatkozó átlagértékeket és szórásokat (folyamatos vizsgálati adatok esetében), valamint az elváltozások osztályozását.

50. A vizsgálat eredményeinek értékelése szempontjából hasznosak lehetnek a korábbi kontrolladatok, például abban az esetben, ha a párhuzamos kontrollokból származó adatok vélhetően lényegesen eltolódottak az ugyanabban a vizsgálati létesítményben/kolóniában lévő kontrollállatoktól származó újabb adatokhoz képest. Korábbi kontrolladatok elemzése esetén ugyanazon laboratórium által benyújtott, ugyanolyan korú és ugyanabba a törzsbe tartozó állatokra vonatkozó, az adott vizsgálatot megelőző öt évből származó adatokat kell felhasználni.

51. A számszerű eredményeket adott esetben megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazásával kell kiértékelni. A statisztikai módszereket és az elemezendő adatokat a vizsgálat tervezése során kell kiválasztani (8. bekezdés). A kiválasztás során szükség szerint elő kell írni a túlélésre vonatkozó kiigazításokat.

Vizsgálati jegyzőkönyv

52. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— fizikai jelleg, tisztaság, valamint fizikai és kémiai tulajdonságok,

— azonosító adatok,

— a vegyi anyag származási helye,

— gyártási szám,

— kémiai elemzésről szóló tanúsítvány.

Vivőanyag (ha van):

— a vivőanyag kiválasztásának indokolása (ha az nem víz).

Kísérleti állatok:

— a felhasznált faj/törzs, és a választás indokolása,

— az állatok száma, életkora és neme a vizsgálat kezdetekor,

▼M4

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.,

— az egyes állatok testsúlya a vizsgálat kezdetekor,

Vizsgálati körülmények:

— a beadási mód és a dózis kiválasztásának indokolása,

— az adatok elemzéséhez adott esetben használt statisztikai módszerek,

— a vizsgált vegyi anyag formulázására/a takarmány előkészítésére vonatkozó részletes adatok,

— a készítmény elért koncentrációjára, stabilitására és homogenitására vonatkozó analitikai adatok,

— a beadási mód és a vizsgált vegyi anyag bejuttatására vonatkozó részletes adatok,

— inhalációs vizsgálatok esetében információ arra vonatkozóan, hogy a bejuttatás csak orron vagy a teljes testfelületen keresztül történt-e,

— tényleges dózisok (mg/testsúlykilogramm/nap), valamint a vizsgált vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (mg/kg vagy ppm) a tényleges dózisra való átszámításhoz használt átszámítási tényező, ha ez alkalmazható,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok.

Eredmények (az adatok táblázatos összefoglalását és az egyes állatokra vonatkozó adatokat is meg kell adni):

— túlélési adatok,

— testsúly és annak változásai,

— takarmányfogyasztás, a táplálékhasznosítási képességgel kapcsolatos számítások, ha vannak, valamint adott esetben vízfogyasztás,

— toxikus reakcióra vonatkozó adatok nemek és adagolási szintek szerinti csoportosításban, beleértve a toxicitás jeleit,

— a megfigyelt klinikai tünetek jellege, előfordulása (valamint ha pontozzuk, súlyossága) és időtartama (átmeneti vagy állandó),

— szemészeti vizsgálat,

— hematológiai vizsgálatok,

— klinikai biokémiai vizsgálatok,

— vizeletelemzés,

— az esetleges neurotoxicitási vagy immuntoxicitási vizsgálatok eredménye,

— testsúly elpusztuláskor,

— szervek súlya (és ezek aránya, ha alkalmazható),

— boncolási eredmények,

— a kórszövettani vizsgálatok összes, kezeléssel összefüggő eredményének részletes ismertetése,

— abszorpciós adatok, ha rendelkezésre állnak.

▼M4

Az eredmények statisztikai feldolgozása, ha alkalmazható

Az eredmények tárgyalása, beleértve a következőket:

— dózis-válasz összefüggések,

— a hatásmechanizmusra vonatkozó bármely információ figyelembevétele,

— az esetlegesen alkalmazott modellezési megközelítések tárgyalása,

— BMD, NOAEL vagy LOAEL meghatározása,

— korábbi kontrolladatok,

— humán relevancia.

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.

(4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

(5) E melléklet B.27., Szubkrónikus orális toxicitási vizsgálat, 90 napos, ismételt adagolású orális toxicitási vizsgálat nem rágcsálókon című fejezete.

(6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(8) E melléklet B.8., Szubakut inhalációs toxicitás: 28 napos vizsgálat című fejezete.

(9) E melléklet B.29., Szubkrónikus inhalációs toxicitás: 90 napos vizsgálat című fejezete.

(10) E melléklet B.9., Ismételt adagolású (28 napos) toxicitás (dermális) című fejezete.

(11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

▼M4

(14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al*. (2006). A Tiered Approach to LIFE Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(18) ILSI (International LIFE Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(19) Az Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU irányelve (2010. szeptember 22.) a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről HL L 276., 2010.10.20., 33. o.

(20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appéldául Pharmacol. 108: 267-283.

(28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

▼**M4**

(30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appéldául Toxicol. 29: 198-201.

(31) EMEA (draft) document ‘Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity’ (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁS

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼B

B.31. **PRENATÁLIS FEJLŐDÉSI TOXICITÁSVIZSGÁLAT**

1. **MÓDSZER**

Ez a módszer az OECD TG 414 (2001) módszer megfelelője.

1.1. BEVEZETÉS

E fejlődési toxicitási vizsgálati módszer segítségével általános információk nyerhetők a vemhes kísérleti állatot és a méhben fejlődő élő szervezetet érő prenatális expozíció hatásaival kapcsolatosan, és magában foglalhatja az anyai hatások, továbbá a magzatelhalás, a magzatban fellépő strukturális rendellenességek vagy rendellenes növekedés vizsgálatát. A funkcionális defektusok, bár a fejlődés szempontjából igen fontosak, nem képezik szerves részét ennek a módszernek. Az ilyen hatások külön vizsgálat vagy e módszerhez kapcsolódóan kiegészítő vizsgálat keretében tanulmányozhatók a fejlődési neurotoxicitási vizsgálati módszer alkalmazásával. A funkcionális defektusok és más posztnatális hatások vizsgálatára vonatkozó információkkal kapcsolatban a kétgenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálati módszert, valamint a fejlődési neurotoxicitási vizsgálati módszert kell segítségül hívni adott esetben.

E vizsgálati módszert esetenként a vizsgálandó anyaggal, így például annak fizikai-kémiai vagy toxikológiai tulajdonságaival kapcsolatos konkrét ismeretek alapján egyedi esetekhez kell adaptálni. Az ilyen adaptáció akkor elfogadható, ha meggyőző tudományos bizonyítékok szerint informatívabb vizsgálatot eredményez. Ilyen esetben a tudományos bizonyítékokat részletesen ismertetni kell a vizsgálati jelentésben.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Fejlődési toxikológia: a fogantatás előtt vagy a prenatális fejlődés során, vagy a születés és szexuális érés közötti időszakban (posztnatálisan) történő expozícióból származó, a fejlődő élő szervezetet érő káros hatások vizsgálata. A fejlődési toxicitás fő megnyilvánulásai: 1. az élő szervezet elhalása/elhullása; 2. strukturális rendellenesség; 3. rendellenes növekedés; és 4. funkcionális defektus. A fejlődési toxikológia korábban teratológia néven volt ismert.

Káros hatás: a normálhoz képest bármilyen, a kezeléssel összefüggő elváltozás, amely csökkenti az élő szervezet túlélésre, szaporodásra vagy környezethez való alkalmazkodásra való képességét. A fejlődési toxikológia területén a legszélesebb értelemben véve ide tartozik bármely olyan hatás, amely megzavarja a konceptus normális fejlődését a születés előtt és után.

Rendellenes növekedés: az utód szerveinek vagy testének tömegében vagy méretében bekövetkező elváltozás.

Elváltozások (rendellenességek): strukturális elváltozások a fejlődés során, amelyek magukban foglalják mind a deformitásokat, mind az eltéréseket (28).

Deformitás/súlyos fejlődési rendellenesség: az állatra ártalmasnak (vagy akár letálisnak) tartott strukturális változás, amely általában ritka.

▼B

Eltérés/kisebb fejlődési rendellenesség: az állatra kisfokban ártalmasnak vagy ártalmatlannak tartott strukturális változás; lehet átmeneti jellegű, és viszonylag gyakran előfordulhat a kontrollpopulációban.

Konceptus: a megtermékenyített petesejt származékainak összessége a fejlődés bármely szakaszában a megtermékenyítéstől a születésig, amely magában foglalja az extraembrionális burkokat és az embriót vagy magzatot is.

Beágyazódás: a blasztocisztának a méh hámrétegéhez való kapcsolódása, amely magában foglalja a méh hámszövetén történő áthatolást és méhnyálkahártyába történő beágyazódását.

Embrió: az élő szervezet korai vagy fejlődő stádiuma, mégpedig a megtermékenyített petesejtből kialakuló fejlődési produktum a hosszanti tengely megjelenése után, és amíg és az összes főbb struktúra ki nem alakul.

Embriotoxicitás: ártalmas hatás az embrió normál struktúrájára, fejlődésére, növekedésére és/vagy életképességére.

Magzat: a posztembrionális szakaszban lévő, meg nem született utód.

Magzati toxicitás: ártalmas hatás a magzat normál struktúrájára, fejlődésére, növekedésére és/vagy életképességére.

Abortusz: a fogantatás produktumának, azaz az embriónak vagy egy életképtelen magzatnak a méhből történő idő előtti kilökődése/eltávolítása.

Felszívódás: a méhbe beágyazódott, majd elhalt konceptus felszívódik vagy felszívódott.

Korai felszívódás: a beágyazódás nyoma felismerhető embrió/magzat nélkül.

Késői felszívódás: elhalt embrió vagy magzat külső degeneratív változásokkal.

NOAEL: a nem észlelhető káros hatás szintjének (no-observed-adverse-effect-level) rövidítése, amely azt a legmagasabb dóziszszintet vagy expozíciós szintet jelöli, amelynél nem figyelhetők meg a kezeléssel összefüggő káros hatások.

1.3. REFERENCIAANYAG

Nincs.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgálandó anyagot általában vemhes állatoknak adagolják legalább a beágyazódástól az exterminálás tervezett időpontját megelőző napig, amelynek a lehető legközelebb kell esnie az ellés normál napjához anélkül, hogy az idő előtti ellés miatt felmerülne az adatok elvesztésének kockázata. A vizsgálati módszerrel nemcsak az organogenezis időszakát (pl. rágcsálókban az 5. és 15. nap közötti időszak, nyúlban pedig a 6. és 18. nap közötti időszak) lehet vizsgálni, hanem már a beágyazódás előtti időszaktól kezdve adott esetben az egész vemhességen át a császármetszés előtti napig jelentkező hatásokat is. Röviddel a császármetszés előtt a nőstényeket exterminálni kell, és meg kell vizsgálni a méhtartalmat, a magzatok esetében pedig meg kell vizsgálni a külsőleg látható rendellenességeket, valamint a lágyszövetben és vázrendszerben észlelhető elváltozásokat.

▼B

1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ISMERTETÉSE

1.5.1. **Az állatfaj kiválasztása**

Ajánlatos a vizsgálatot az erre legalkalmasabb fajban végezni, és olyan laboratóriumi fajt és törzset alkalmazni, amelyet széles körben használnak prenatális fejlődési toxicitási vizsgálatokhoz. A preferált rágcsálófaj a patkány, a preferált nem rágcsálófaj pedig a nyúl. Az ettől eltérő fajok alkalmazását megfelelően indokolni kell.

1.5.2. **Az állatok tartásának és etetésének körülményei**

Rágcsálók esetében a kísérleti helyiség hőmérsékletének 22 °C (± 3 °C)-nak, nyulak esetében pedig 18 °C (± 3 °C)-nak kell lennie. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50 és 60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

A pároztatásokat erre a célra alkalmas ketrecekben kell végezni. Bár előnyösebb a pároztatott állatokat egyedileg tartani, kis számban csoportos tartás is elfogadható.

1.5.3. **Az állatok előkészítése**

Legalább 5 napon át a laboratórium körülményeihez szoktatott, egészséges állatokat kell alkalmazni, amelyek korábban nem voltak más kísérlet alanyai. A kísérleti állatok jellemzésekor meg kell adni az állat faját, törzsét, származását, ivarát, testtömegét és/vagy életkorát. Amennyire csak megoldható, az állatok az összes vizsgálati csoportban legyenek azonos testtömegűek és korúak. Minden dózishoz még egyszer sem ellett, fiatal felnőtt nőstényeket kell használni. A nőstényeket azonos fajú és azonos törzsből származó hímekkel kell pároztatni, és kerülni kell a testvérek pároztatását. Rágcsálók esetében a vemhesség 0. napja az, amikor hüvelydugó és/vagy sperma észlelhető; nyulak esetében a 0. nap általában a párzás vagy a mesterséges megtermékenyítés napja, ha ezt a technikát alkalmazzák. A pároztatott nőstényeket torzítatlan módon kell a kontroll- és a kezelési csoportokba beosztani. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezése jelentette lehetséges hatásokat. Minden állatot egyedi azonosítószámmal kell ellátni. A pároztatott nőstényeket torzítatlan módon kell beosztani a kontroll- és a kezelési csoportokba, és ha a nőstényeket csoportosan pároztatják, az egyes pároztatási csoportokból származó állatokat egyenletesen kell elosztani a kezelési és kontrollcsoportokban. Az azonos hímmel pároztatott nőstényeket is egyenletesen kell szétosztani a különböző csoportokba.

1.6. ELJÁRÁS

1.6.1. **Az állatok száma és ivara**

Minden vizsgálati és kontrollcsoportba elegendő számú nőstényt kell beosztani ahhoz, hogy legalább körülbelül 20 olyan nőstény álljon rendelkezésre, amelyekben a boncoláskor beágyazódási helyek találhatók. A 16-nál kevesebb nőstényt – amelyekben beágyazódási helyek találhatók – tartalmazó csoportok esetleg nem megfelelőek a vizsgálatra. Az anyaállatok elhullása nem feltétlenül teszi érvénytelenné a vizsgálatot, feltéve hogy az arány nem haladja meg a körülbelül 10 %-ot.

▼B

1.6.2. **A dózisok előkészítése**

Ha a beadás megkönnyítése érdekében vivőanyagot vagy más adalékot alkalmaznak, a következő jellemzőket kell figyelembe venni: a vizsgálandó anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára és visszatartására vagy kiürülésére gyakorolt hatások; a vizsgálandó anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt hatások, amelyek megváltoztathatják annak toxikus jellemzőit; valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások. A vivőanyag nem lehet fejlődésre toxikus, és nem lehet hatással a szaporodásra sem.

1.6.3. **Adagolás**

A vizsgálandó anyagot általában naponta kell beadni, a beágyazódástól (pl. a pároztatás utáni 5. naptól) a császármetszés tervezett időpontja előtti napig. Ha az esetlegesen végzett előzetes vizsgálatok szerint nincs nagy valószínűsége a beágyazódás előtti veszteségnek, a kezelést az egész vemhességi időszakra ki lehet terjeszteni, azaz a pároztatástól egészen az exterminálás tervezett időpontja előtti napig. Jól ismert, hogy a vemhesség során a nem megfelelő bánásmód vagy stressz prenatális veszteséghez vezethet. A kezeléssel nem összefüggő tényezők miatti prenatális veszteség kivédése érdekében kerülni kell a vemhes állatok szükségtelen kezelését, valamint a külső tényezők, így például zaj miatti stresszt.

Legalább három dózisszintet és ezzel párhuzamos kontrollt kell alkalmazni. A kezelési és kontrollcsoportokba egészséges állatokat kell torzítatlan módon beosztani. A dózisszinteket úgy kell megválasztani, hogy biztosítsák a kiváltott toxikus hatások fokozatosságát. Hacsak a vizsgálandó anyag fizikai/kémiai jellege vagy biológiai tulajdonságai nem szabnak ennek határt, a legmagasabb dózist úgy kell megválasztani, hogy valamilyen mértékű fejlődési és/vagy anyai toxicitást (klinikai tünetek vagy testtömegcsökkenés) idézzen elő, de ne okozzon elhullást vagy súlyos szenvedést. A legalább egy köztes dózist úgy kell megválasztani, hogy minimális mértékű észlelhető toxikus hatást váltson ki. Végül a legalacsonyabb dózist úgy kell megválasztani, hogy semmilyen anyai vagy fejlődési toxicitásra utaló tünetet ne okozzon. A dózisok csökkenő sorrendjét úgy kell megválasztani, hogy demonstrálhassák az esetleges dózisfüggő válaszokat és a nem észlelhető káros hatás szintjét (NOAEL). A csökkenő dózisszintek meghatározásához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása és nagyon nagy intervallumok (pl. 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazása, esetén gyakran előnyös a dózisok közé egy negyedik vizsgálati csoportot is beiktatni. Bár a cél az anyai NOAEL meghatározása, olyan vizsgálatok is elfogadhatók, amelyben nem határozzák meg ezt (1).

A dózisszintek megválasztásakor figyelembe kell venni mind az esetleg rendelkezésre álló toxicitási adatokat, mind a vizsgálandó anyag vagy rokon anyagok metabolizmusával vagy toxikokinetikájával kapcsolatos további információkat. Ezek az információk segítik majd az adagolási rend megfelelő voltának igazolását is.

Szükség van egy párhuzamos kontrollcsoportra is. Ez a csoport egy placebóval kezelt kontrollcsoport, vagy ha a vizsgálandó anyag beadásához vivőanyagot használnak, akkor egy vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport. Minden csoportban ugyanolyan térfogatú vizsgálandó anyagot vagy vivőanyagot kell beadni. A kontrollcsoport(ok)ba tartozó állatokat ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. A vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportokban a legnagyobb alkalmazott mennyiségben kell beadni a vivőanyagot (ahogyan a legalacsonyabb dózisú kezelési csoportban).

▼B

1.6.4. **Határérték-vizsgálat**

Ha egy egyetlen, legalább 1 000 mg/testtömeg-kg/nap orális dózis alkalmazásával történő és az itt ismertetett eljárások szerint elvégzett vizsgálat sem a vemhes állatokban, sem utódaikban nem idéz elő észlelhető toxicitást, és ha egy hatás a rendelkezésre álló adatok (pl. szerkezetileg és/vagy metabolizmus szempontjából rokon vegyületekkel kapcsolatos adatok) alapján nem várható, a három dózisszint alkalmazásával történő teljes vizsgálatot esetenként szükségtelen elvégezni. A várható humán expozíció magasabb orális dózis alkalmazását teszi esetleg szükségessé a határérték-vizsgálat során. Más típusú beadási módok, így például inhalálás vagy dermális alkalmazás esetén a vizsgálandó anyag fizikai-kémiai tulajdonságai gyakran előre jelezhetik, illetve behatárolhatják a lehetséges expozíciós szint maximumát (például a dermális alkalmazás nem okozhat súlyos lokális toxicitást).

1.6.5. **A dózisok beadása**

A vizsgálandó anyagot vagy vivőanyagot általában orálisan, intubálással adagolják. Ha más beadási módot alkalmaznak, a vizsgálatot végzőnek ezt részletesen indokolnia kell, és szükség lehet ennek megfelelő módosításokra is (2) (3) (4). A vizsgálandó anyagot minden nap körülbelül ugyanabban az időpontban kell beadni.

Az egyes állatoknak beadandó dózist általában a legutóbbi testtömegmérés eredménye alapján kell meghatározni. A vemhesség utolsó trimeszterében azonban óvatosan kell eljárni a dózis beállításakor. A túlzott anyai toxicitás megelőzése érdekében a dózisok megválasztásához fel kell használni a meglévő adatokat. Ha azonban túlzott toxicitást észlelnek a kezelt anyaállatokban, humánus módon exterminálni kell őket. Ha több vemhes állatban is a túlzott toxicitás jelei észlelhetők, meg kell fontolni az adott dóziscsoport kezelésének leállítását. Ha az anyagot mesterséges táplálással adagoljuk, a dózist lehetőleg egyszerre kell egy gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át beadni az állatnak. Az, hogy egyszerre maximálisan mekkora térfogatú folyadékot lehet beadni, az állat méretétől függ. A térfogat nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömegarányt, kivéve vizes oldatok esetében, amikor 2 ml/100 g testtömegarány is alkalmazható. Ha vivőanyagként kukoricacsíra-olajat alkalmaznak, az egyszerre beadott térfogat nem lehet több mint 0,4 ml/100 g testtömeg. A koncentrációk megfelelő beállításával minimalizálni kell a beadott térfogat variabilitását, és így kell biztosítani, hogy minden dózisszintnél azonos legyen a térfogat.

1.6.6. **Az anyaállatok megfigyelése**

Legalább naponta egyszer el kell végezni, és le kell jegyezni a klinikai megfigyeléseket, mégpedig lehetőleg a mindig ugyanabban az időpontban vagy időpontokban, amihez figyelembe kell venni azt is, hogy a beadás után várt hatások mikor érik el a maximumukat. Rögzíteni kell az állatok állapotát, ezen belül elhullását, elhullás közelében lévő állapotát, lényeges viselkedésbeli változásait, illetve a szemmel látható toxicitás minden jelét.

1.6.7. **Testtömeg és táplálékfogyasztás**

A vemhesség 0. napján, vagy ha külső forrásból beszerzett, adott időben pároztatott állatokat alkalmaznak, akkor legkésőbb a vemhesség 3. napján, majd a kezelés első napján és azt követően a kezelési időszakban legalább 3 naponta, továbbá az exterminálás tervezett napján meg kell mérni az állatok testtömegét.

▼B

A táplálékfogyasztást háromnaponta kell feljegyezni, ezen belül is ugyanazon a napon, amikor a testtömegméréseket végzik.

1.6.8. **Post mortem vizsgálat**

A nőstényeket az ellés várható időpontját megelőző napon kell exterminálni. Az exterminálás tervezett időpontja előtt abortusz vagy koraellés jeleit mutató nőstényeket exterminálni kell, majd a tetemeket alapos makroszkópos vizsgálatnak kell alávetni.

A vizsgálat befejezésekor vagy a vizsgálat során bekövetkező elhullás során makroszkóposan meg kell vizsgálni az anyaállatban az esetleges strukturális rendellenességeket vagy patológiás elváltozásokat. A torzítások minimalizálása érdekében a császármetszés során az anyaállatok, majd ezt követően a magzatok vizsgálatát lehetőleg anélkül kell végezni, hogy tudható lenne, melyik kezelési vagy kontrollcsoportból származnak.

1.6.9. **A méhtartalom vizsgálata**

A vizsgálat befejezésekor vagy az elhullás után amilyen gyorsan csak lehet, ki kell venni az állatok méhét, és ellenőrizni kell, hogy vemhesek voltak-e. Azokat a méheket, amelyek nem tűnnek vemhesnek, további vizsgálatoknak (pl. rágcsálók esetében ammónium-szulfid-festésnek, nyulak esetében pedig Salewski-festésnek vagy más megfelelő eljárásnak) kell alávetni annak igazolása érdekében, hogy az állat valóban nem volt vemhes (5).

A vemhes méheket a méhnyakkal együtt meg kell mérni. Nem kell megmérni azoknak a vemhes méheknek a tömegét, amelyeket a vizsgálat során elhullott állatokból vettek ki.

A vemhes állatokban meg kell határozni a sárgatestek számát is.

A méhtartalom vizsgálatakor meg kell határozni, hogy hány embrió vagy magzat halt el, illetve hogy hány életképes magzatot tartalmaz. Le kell írni a felszívódás mértékét, hogy megbecsülhető legyen a konceptus elhalásának relatív időpontja (lásd 1.2. szakasz).

1.6.10. **A magzatok vizsgálata**

Minden magzat esetében meg kell határozni a magzat ivarát és testtömegét.

Minden magzat esetében meg kell továbbá vizsgálni, hogy vannak-e külső elváltozások (6).

A magzatokban meg kell vizsgálni, hogy vannak-e vázrendszeri és lágyszöveti elváltozások (pl. eltérések és deformitások vagy rendellenességek) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Előnyös, de nem feltétlenül szükséges a magzati elváltozások kategorizálása. Ha elvégezzük a kategorizálást, világosan meg kell jelölni az egyes kategóriák meghatározásának kritériumait. Különös figyelmet kell szentelni a szaporítószervek vizsgálatának, és ezen belül a rendellenes fejlődés jeleinek.

Rágcsálók esetében körülbelül az alom felét kell előkészíteni a vázrendszeri, a maradékot pedig a lágyszöveti elváltozások vizsgálatára, ahol az utóbbihoz elfogadott és megfelelő sorozatmetszési módszereket vagy óvatos makroszkópos boncolási technikákat kell alkalmazni.

▼B

Nem rágcsálók, pl. nyulak esetében, minden magzatban meg kell vizsgálni mind a lágyszöveti, mind pedig a vázrendszeri elváltozásokat. A lágyszöveti elváltozások vizsgálatához a magzatok testét óvatos boncolás segítségével kell értékelni, amely magában foglalhatja a belső szívstruktúra további tanulmányozását is (25). Az így megvizsgált magzatok felénél el kell távolítani a fejet, és elő kell készíteni az abban lévő lágy szövetek (szem, agy, orrjáratok és nyelv) vizsgálatára, amelyhez standard sorozatmetszési módszereket (26) vagy más, ugyanilyen érzékeny módszert kell alkalmazni. A testeket, illetve a fennmaradó ép magzatok testét elő kell készíteni a vázrendszeri elváltozások vizsgálatára, amelyhez ugyanazokat a módszereket kell használni, mint rágcsálók esetében.

2. **ADATOK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Az adatokat mind az anyaállatok, mind utódaik esetében egyedileg kell a jelentésben rögzíteni, majd táblázatos formában is össze kell foglalni, amelyben minden egyes vizsgálati csoport és generáció esetében fel kell tüntetni az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a vizsgálat során elpusztult vagy humánus okok miatt exterminált állatok számát, valamint az elhullások és a humánus exterminációk időpontját, a vemhes nőstények számát, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ezen belül bármely toxikus tünet megjelenésének időpontját, valamint ezek időtartamát és súlyosságát, az embriókkal/magzatokkal kapcsolatos megfigyeléseket és az almokra vonatkozó minden vonatkozó adatot.

A számszerű eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell kiértékelni, amelynél az adatanalízishez használt egység az alom. Általánosan elfogadott statisztikai módszert kell használni; a vizsgálat megtervezése során kell azt kiválasztani, és a választást meg kell indokolni. A jelentésben fel kell tüntetni azoknak az állatoknak az adatait is, amelyek nem maradtak életben a tervezett exterminálásuk időpontjáig. Adott esetben a csoportátlagok számításához is fel lehet használni ezeket az adatokat. Az ilyen állatokból nyert adatok alkalmazhatóságát, és így a csoportátlag(ok)ba való beszámításukat vagy abból való kizárásukat minden esetben egyedileg kell meghatározni, és megfelelően indokolni is kell.

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A prenatális fejlődési toxicitási vizsgálat eredményeit a megfigyelt hatások szempontjából kell értékelni. Az értékelés az alábbi információkat foglalja magában:

— az anyaállatok és az embriók/magzatok vizsgálatainak eredményei, ezen belül az állat expozíciója és az egyes hatások gyakorisága vagy súlyossága közötti összefüggések vagy azok hiányának értékelése,

— a magzatok külső, lágyszöveti és vázrendszeri elváltozásainak esetleges kategorizálásánál alkalmazott kritériumok,

▼B

— a vizsgálat eredményeinek értelmezését javítandó, adott esetben korábbi kontrolladatok,

— az összes százalék és mérőszám számításához felhasznált számadatok,

— adott esetben a vizsgálat eredményeinek megfelelő statisztikai elemzése, amelynek elegendő információt kell tartalmaznia az elemzési módszerrel kapcsolatban ahhoz, hogy egy független bíráló vagy statisztikus újra tudja értékelni vagy rekonstruálni tudja az elemzést.

Bármely olyan vizsgálatban, amely a toxikus hatások hiányát igazolja, további vizsgálatokat kell végezni a vizsgálandó anyag felszívódásának és biológiai hozzáférhetőségének meghatározására.

2.3. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A prenatális fejlődési toxicitási vizsgálatokkal a vemhesség során egy anyaggal történő ismételt expozíciónak az anyaállatra és utódai méhen belüli fejlődésére gyakorolt hatásai tanulmányozhatóak. A vizsgálat eredményeit a szubkrónikus, reprodukciós, toxikokinetikai és egyéb vizsgálatok eredményeivel összefüggésben kell értelmezni. Mivel mind az általános toxicitásra (az anyai toxicitás révén), mind pedig a fejlődési toxicitási végpontokra hangsúly kerül, a vizsgálat eredményei bizonyos mértékig lehetővé teszik az általános toxicitás hiányában is fellépő, a fejlődésre gyakorolt hatások megkülönböztetését azoktól, amelyeket az anyaállatra is toxikus szintek idéznek elő (27).

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A jelentésnek az alábbi konkrét információkat kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

— fizikai jelleg és ahol fontos, fizikai-kémiai tulajdonságok,

— megjelölés, és ezen belül – ha ismert, vagy meghatározták – a CAS-szám,

— tisztaság.

Vivőanyag (ha szükséges):

— ha a vivőanyag nem víz, akkor ennek indoklása.

Kísérleti állatok:

— az alkalmazott faj és törzs,

— az állatok száma és életkora,

— származás, tartási körülmények, takarmány stb.,

— az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetén.

Kísérleti körülmények:

— a dózisszintek megválasztásának indoklása,

— a vizsgálandó anyag formulázásával/a táplálék előkészítésével, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenitásával kapcsolatos információk,

▼B

— a vizsgálandó anyag adagolásának adatai,

— adott esetben a vizsgálandó anyag táplálékban/ivóvízben lévő koncentrációjának (ppm) átszámítása a tényleges dózisra (mg/testtömeg-kg/nap),

— környezeti feltételek,

— a táplálék és az ivóvíz minőségével kapcsolatos adatok.

Eredmények:

Anyai toxikus válaszadatok a dózis függvényében, ezen belül többek között:

— az állatok száma a vizsgálat kezdetén, az életben maradt állatok száma, továbbá a vemhes, az abortáló és a koraellő állatok száma,

— az esetleges vizsgálat közbeni elhullás időpontja, vagy hogy az állat életben maradt-e az exterminálás időpontjáig,

— a tervezett exterminálás előtt elpusztult állatok adatait is bele kell foglalni a jelentésbe, de a csoportok közötti statisztikai összehasonlításokba nem,

— az egyes rendellenes klinikai tünetek megfigyelésének időpontja, valamint ezek későbbi lefolyása,

— testtömeg, testtömegváltozás és a vemhes méhek tömege, ezen belül adott esetben a vemhes méh tömegével korrigált testtömegváltozás,

— táplálékfogyasztás és, ha mérve volt, vízfogyasztás,

— boncolási eredmények, ezen belül a méh tömege,

— a jelentésben fel kell tüntetni az anyai és fejlődési hatásokra vonatkozó NOAEL-értékeket is.

Fejlődési végpontok a dózis függvényében azokra az almokra vonatkozóan, ahol beágyazódás történt, ezen belül:

— a sárgatestek száma,

— a beágyazódások száma, az élő és elhalt magzatok és a felszívódások száma, valamint százalékos aránya,

— a beágyazódás előtti és után veszteségek száma és százalékos aránya.

Fejlődési végpontok a dózis függvényében azokra az almokra vonatkozóan, ahol élő magzatok vannak, ezen belül:

— az élő utódok száma és százalékos aránya,

— ivararány,

— a magzatok testtömege, lehetőleg ivaronként külön, és együtt is,

— külső, lágyszöveti és vázrendszeri deformitások, valamint más lényeges elváltozások,

— adott esetben a kategorizálás kritériumai,

▼B

— a külső, lágyszöveti és vázrendszeri elváltozásokat mutató magzatok és almok összesített száma és százalékos aránya, valamint az egyedi rendellenességek és más lényeges elváltozások típusa és gyakorisága.

Az eredmények diszkussziója.

Következtetések.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(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 Experimentelle Pathologie* 247:367.

(6) Edwards, J.A. (1968). The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In Advances in Teratology. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976). Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 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, RE. 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, TE. (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. A RÁKKELTŐ HATÁS VIZSGÁLATA

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 451. vizsgálati iránymutatásában (2009) leírt módszerrel. A rákkeltő hatás vizsgálatára vonatkozó eredeti 451. vizsgálati iránymutatást 1981-ben fogadták el. A jelen felülvizsgált B.32. vizsgálati módszer kidolgozását az állatjóllét és a szabályozási követelmények terén az elmúlt időszakban bekövetkezett változások figyelembevétele érdekében tartották szükségesnek (2) (3) (4) (5) (6). E B.32. vizsgálati módszer frissítése e melléklet B.30., Krónikus toxicitási vizsgálatok című és B.33., A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata című fejezetének felülvizsgálatával párhuzamosan történt meg a vizsgálatban alkalmazott állatokra vonatkozó további információk megszerzése, valamint a dózis kiválasztásával kapcsolatos további részletek biztosítása céljából. A jelen B.32. vizsgálati módszer vegyi anyagok széles skálájának vizsgálatára szolgál, beleértve a növényvédő szereket és az ipari vegyszereket. Meg kell jegyezni azonban, hogy gyógyszeranyagok esetében néhány részlet és követelmény eltérő lehet (lásd: International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals).

2. A rákkeltő hatással foglalkozó vizsgálatok többségét rágcsálófajokon végzik, ezért a jelen vizsgálati módszer elsősorban az e fajokon végzett vizsgálatokra alkalmazandó. Amennyiben az ilyen vizsgálatokat rágcsálóktól eltérő fajokon kell elvégezni, a megfelelő módosításokkal a jelen vizsgálati módszerben vázolt elvek és eljárások alkalmazandók, az e melléklet B.27., 90 napos, ismételt adagolású orális toxicitási vizsgálat nem rágcsálókon című fejezetében (6) vázoltakkal együtt. További útmutatás a krónikus toxicitási vizsgálatok és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok tervezésére és elvégzésére vonatkozó 116. OECD-iránymutatásban (7) található.

3. A rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során alkalmazott három fő beadási mód az orális, a dermális és az inhalációs. A beadási mód kiválasztása függ a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, valamint az emberi expozíció jellemző módjától. Az expozíciós mód kiválasztására vonatkozó további információk a 116. iránymutatásban találhatók (7).

4. A jelen vizsgálati módszer az orális expozíciós módra összpontosít, amely a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során a leggyakrabban alkalmazott mód. Az emberi egészségre jelentett kockázat értékeléséhez és/vagy bizonyos szabályozási rendszerek előírásai alapján dermális vagy inhalációs expozíciót alkalmazó, rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok elvégzésére is szükség lehet ugyan, azonban technikai szempontból e két expozíciós mód mindegyike igen összetett. Az ilyen vizsgálatokat eseti alapon kell megtervezni, bár az itt ismertetett, a rákkeltő hatás orális beadás útján történő meghatározására és értékelésére szolgáló vizsgálati módszer a kezelési időszakokra, klinikai és patológiai paraméterekre stb. vonatkozó ajánlások tekintetében alapul szolgálhat az inhalációs és/vagy dermális vizsgálatokra vonatkozó protokollhoz. A vizsgált vegyi anyagok dermális (7) és inhalációs (7) (8) módon történő beadásával kapcsolatban OECD-iránymutatások állnak rendelkezésre. E melléklet B.8. (9) és B.29. fejezetét (10), valamint az akut inhalációs vizsgálatra vonatkozó OECD-iránymutatást (8) kifejezetten alkalmazni kell az inhalációs expozíciót alkalmazó, hosszabb távú vizsgálatok tervezése során. A dermális beadással végzett vizsgálatok esetében e melléklet B.9. fejezetét (11) kell alkalmazni.

▼M4

5. A rákkeltő hatás vizsgálata információt szolgáltat az ismételt, a vizsgált fajok élettartamának akár egészére is kiterjedő expozícióból valószínűsíthetően fakadó egészségügyi kockázatokról. A vizsgálat információkkal szolgál a vizsgált vegyi anyag toxikus hatásairól, beleértve a lehetséges rákkeltő hatást, továbbá jelezheti a célszerveket és a felhalmozódás lehetőségét. Becslést adhat a toxikus hatások észlelhető káros hatással nem járó szintjére, valamint a nem genotoxikus karcinogének esetében a tumorválaszra nézve, amely felhasználható az emberi expozícióra vonatkozó biztonsági kritériumok meghatározásához. Hangsúlyos szerepet kap az állatok lehető legtöbb információ megszerzése érdekében történő körültekintő klinikai vizsgálatának szükségessége is.

6. A jelen vizsgálati módszerben ismertetett, rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok célkitűzései többek között a következők:

— a vizsgált vegyi anyag rákkeltő tulajdonságainak meghatározása, amelyek a párhuzamos kontrollcsoportokhoz viszonyítva megnövelik a neoplazmák gyakoriságát, megnövelik a rosszindulatú neoplazmák arányát vagy lerövidítik a neoplazmák megjelenéséhez szükséges időt,

— a rákkeltő hatás célszervének (célszerveinek) meghatározása,

— a neoplazmák megjelenési idejének meghatározása,

— a tumorok kialakulásával kapcsolatos dózis-válasz összefüggés jellemzőinek meghatározása,

— a nem észlelhető káros hatás szintjének (NOAEL) vagy a benchmark-dózis (BMD) meghatározásához szükséges kiindulópontnak a meghatározása,

— a rákkeltő hatások extrapolálása az alacsony dózisú emberi expozíciós szintekre,

— a hatásmechanizmusra vonatkozó hipotézisek vizsgálatához szükséges adatok biztosítása (2) (7) (12) (13) (14) (15).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

7. A vizsgált vegyi anyag potenciális rákkeltő hatásának vizsgálata és értékelése során a vizsgálati laboratóriumnak a vizsgált vegyi anyagra vonatkozó összes rendelkezésre álló információt figyelembe kell vennie a vizsgálat megkezdését megelőzően annak érdekében, hogy a vizsgálati terv a lehetséges rákkeltő hatás hatékonyabb vizsgálatára összpontosítson, valamint hogy az állatkísérleteket minimálisra csökkentsük. A feltételezett karcinogén hatásmechanizmusára vonatkozó információk és a hatásmechanizmus figyelembevétele (2) (7) (12) (13) (14) (15) különösen fontos, mivel az optimális terv eltérő lehet attól függően, hogy a vizsgált vegyi anyag ismert vagy feltételezett genotoxikus karcinogén-e. A hatásmechanizmus figyelembevételére vonatkozó további útmutatás a 116. iránymutatásban (7) szerepel.

8. A vizsgálat megtervezését segítő információk többek között a vizsgált vegyi anyag azonossága, kémiai szerkezete, valamint fizikai és kémiai tulajdonságai, bármely *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálat eredményei, beleértve a genotoxicitási vizsgálatokéit, a várható felhasználási terület(ek) és az emberi expozíció lehetősége, a szerkezetileg rokon vegyi anyagok rendelkezésre álló (Q)SAR-adatai, mutagenitásra/genotoxicitásra, rákkeltő hatásra vonatkozó és egyéb toxikológiai adatai, a rendelkezésre álló toxikokinetikai adatok (egyszeri dózisra és lehetőség szerint ismételt dózisra vonatkozó kinetikai adatok), valamint egyéb ismételt expozíciós vizsgálatokból származó adatok.

▼M4

A rákkeltő hatás értékelése a toxicitásra vonatkozó, 28 napos vagy 90 napos ismételt dózisú toxicitásvizsgálatokból származó kezdeti információk megszerzését követően végezendő el. A rák előidézésére, illetve elősegítésére vonatkozó rövid távú vizsgálatok szintén hasznos információkat szolgáltathatnak. Az adott vizsgált vegyi anyag lehetséges egészségkárosító hatásai átfogó vizsgálatának részeként a rákkeltő hatás vizsgálatának fokozatos megközelítését kell megfontolni (16) (17) (18) (19).

9. Az eredmények elemzése szempontjából legmegfelelőbb statisztikai módszereket az adott kísérleti tervre és célkitűzésekre tekintettel a vizsgálat kezdetét megelőzően kell meghatározni. A megfontolandó kérdések közé tartozik, hogy tartalmazzanak-e a statisztikák a túléléssel kapcsolatos kiigazítást, a kumulatív tumorkockázat túlélési időtartamhoz viszonyított elemzését, a tumor kialakulási idejének elemzését, valamint egy vagy több csoport idő előtti megszüntetése esetén végzett elemzést. A megfelelő statisztikai elemzésekre vonatkozó útmutatást, továbbá a nemzetközileg elfogadott statisztikai módszerekre vonatkozó főbb hivatkozásokat a 116. iránymutatás (7), valamint a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok elemzésével és értékelésével kapcsolatos 35. iránymutatás (20) tartalmazza.

10. A rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok elvégzése során a klinikai tünetek mint a biztonsági értékeléshez használt kísérleti állatok humánus végpontjai felismeréséről, értékeléséről és használatáról szóló 19. OECD-iránymutatásban (21), különösen annak 62. bekezdésében ismertetett vezérelveket és szempontokat minden esetben követni kell. E bekezdés szerint: „*Ha az ismételt adagolást alkalmazó vizsgálatok során egy állat progresszív, az állapot további romlásához vezető klinikai tüneteket mutat, tájékozott döntést kell hozni az állat humánus elpusztítására vonatkozóan. A döntéshozatal során mérlegelni kell az állat vizsgálatának folytatása révén szerezhető információk értékét az állat általános állapotához viszonyítva. Ha úgy döntünk, hogy az állatot továbbra is vizsgálni kell, a megfigyelések gyakoriságát szükség szerint növelni kell. Ha ez nem befolyásolja hátrányosan a vizsgálat céljának elérését, lehetséges az adagolás átmeneti szüneteltetése – ha ez csökkenti a fájdalmat vagy a szorongást – vagy a vizsgálati dózis csökkentése.*”

11. A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során alkalmazott dózisok kiválasztásnak elveire vonatkozó részletes útmutatás és ezen elvek leírása a 116. iránymutatásban (7), valamint a Nemzetközi Élettudományi Intézet két kiadványában található (22) (23). A fő dózis-kiválasztási stratégia a vizsgálat elsődleges célkitűzésétől vagy célkitűzéseitől függ (6. bekezdés). A megfelelő dózisszintek kiválasztásakor egyensúlyt kell találni egyfelől a veszélyesség vizsgálata, másfelől az alacsony dózisra adott válaszok jellemzése és azok relevanciája között. Ez különösen lényeges a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata (e melléklet B.33. fejezete) esetében (12. bekezdés).

12. Meg kell fontolni a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálatának elvégzését (e melléklet B.33. fejezete) a krónikus toxicitási vizsgálat (e melléklet B.30. fejezete) és a rákkeltő hatás vizsgálatának (a jelen B.32. vizsgálati módszer) külön-külön történő elvégzése helyett. A két külön vizsgálat elvégzéséhez viszonyítva az együttes vizsgálat idő- és költséghatékonyabb anélkül, hogy befolyásolná az adatok minőségét a krónikus fázisban vagy a karcinogenitási fázisban. A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata során (e melléklet B.33. fejezete) azonban körültekintően figyelembe kell venni a dóziskiválasztás elveit (11. és 22–25. bekezdés), továbbá azt is meg kell jegyezni, hogy bizonyos szabályozási keretrendszerek a vizsgálatok külön-külön történő elvégzését írhatják elő.

▼M4

13. A jelen vizsgálati módszerrel összefüggésében használt fogalmak meghatározása a jelen fejezet végén és a 116. iránymutatásban található (7).

A VIZSGÁLAT ELVE

14. A vizsgált vegyi anyagot naponta, fokozatosan emelkedő dózisokban, általában orális úton adjuk be a vizsgált állatok több csoportjának az élettartamuk jelentős részén keresztül. Inhalációs vagy dermális bejuttatással történő vizsgálat is megfelelő lehet. Az állatokat gondosan megfigyeljük a toxicitás jeleinek és a neoplasztikus elváltozások kialakulásának észlelése érdekében. A vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított állatokat felboncoljuk, továbbá a vizsgálat befejezése után az életben maradt állatokat is elpusztítjuk és felboncoljuk.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

15. A jelen vizsgálati módszer elsősorban a rákkeltő hatás rágcsálókban történő vizsgálatával és értékelésével foglalkozik (2. bekezdés). A rágcsálóktól eltérő fajok használata fontolóra vehető, ha a rendelkezésre álló adatok arra utalnak, hogy az ilyen fajok relevánsabbak az emberekre gyakorolt egészségi hatások előrejelzése tekintetében. A faj kiválasztását indokolni kell. Az előnyben részesítendő rágcsálófaj a patkány, de más rágcsálófaj, például az egér is használható. Habár az egér használatának hasznossága a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során korlátozott lehet (24) (25) (26), néhány jelenlegi szabályozási program megköveteli a rákkeltő hatás egereken történő vizsgálatát, hacsak nem nyert megállapítást, hogy az ilyen vizsgálat tudományos szempontból nem szükséges. A patkányok és az egerek a viszonylag rövid élettartamuk, gyógyszerészeti és toxikológiai vizsgálatokban elterjedt használatuk, a tumorindukcióra való fogékonyságuk, valamint a megfelelően jellemzett törzsek rendelkezésre állása miatt preferált kísérleti modellek. E tulajdonságok eredményeképpen nagy mennyiségű információ áll rendelkezésre fiziológiájukról és patológiájukról. A faj és törzs kiválasztására vonatkozó további információk a 116. iránymutatásban találhatók (7).

16. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal, ivarérett állatokat kell alkalmazni. A rákkeltő hatás vizsgálatát lehetőleg olyan állatokon kell elvégezni, amelyek törzse és eredete megegyezik a rövidebb időtartamú előzetes toxicitási vizsgálat(ok)ban felhasznált állatokéval, habár ha ismert, hogy az ehhez a törzshöz tartozó és ilyen eredetű állatoknál problémák jelentkeznek a hosszú távú vizsgálatok esetében általánosan elfogadott túlélési szempontok teljesítése tekintetében (lásd a 116. iránymutatást (7)), fontolóra kell venni egy, a hosszú távú vizsgálatok esetében elfogadható túlélési aránnyal rendelkező állattörzs használatát. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek.

Az állatok tartása és etetése

17. Az állatokat külön, vagy azonos nemű egyedekből álló kis csoportokban kell tartani; a külön történő tartást csak akkor kell fontolóra venni, ha az tudományos szempontból indokolt (27) (28) (29). A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezésének lehetséges hatásait. A kísérleti állatok tartására használt helyiség hőmérséklete 22 °C (± 3 °C) kell, hogy legyen. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem szabad meghaladnia a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez hagyományos laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmánynak meg kell felelnie a vizsgált faj összes tápanyagigényének, és a vizsgálat eredményét esetlegesen befolyásoló takarmány-szennyeződések mennyiségének – beleértve többek között a növényvédőszer-maradványokat,

▼M4

a perzisztens szerves szennyező anyagokat, a fitoösztrogéneket, a nehézfémeket és a mikotoxinokat – a lehető legalacsonyabbnak kell lennie. A tápanyagokban és takarmányokban lévő szennyező anyagok szintjére vonatkozó analitikai információkat időszakos jelleggel kell meghatározni, legalább a vizsgálat kezdetekor, valamint amikor változás következik be a felhasznált adagban, és ezeket az információkat a zárójelentésben közölni kell. A vizsgálat során felhasznált ivóvízre vonatkozó analitikai információkat hasonló módon kell megadni. A vizsgált vegyi anyag táplálékkal történő beadása esetén a takarmány megválasztását befolyásolhatja annak szükségessége, hogy az megfelelően keveredjen el a takarmánnyal és kielégítse az állatok táplálkozási igényeit.

Az állatok előkészítése

18. A laboratóriumi körülményekhez legalább 7 napig szoktatott, egészséges állatokat kell használni, amelyek korábban nem voltak kitéve kísérleti eljárásoknak. Rágcsálók esetében az állatoknak történő adagolást az elválasztást és szoktatást követően a lehető leghamarabb, és lehetőleg az állatok 8 hetes kora előtt meg kell kezdeni. A kísérleti állatokat faj, törzs, eredet, nem, súly és életkor szerint kell jellemezni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya az egyes nemeken belül csak minimálisan térhet el egymástól, a vizsgálatban használt összes állat súlyának átlagos értékétől pedig legfeljebb ± 20 %-kal különbözhet mindkét nem esetében. Az állatokat véletlenszerűen kell besorolni a kontroll- és kezelt csoportokba. A véletlenszerű kiválasztást követően nem lehet lényeges különbség az egyes nemeken belül a csoportok átlagos testsúlya között. Ha statisztikailag szignifikáns különbségek fordulnak elő, a véletlenszerű kiválasztás lépését lehetőség szerint meg kell ismételni. Minden egyes állatnak egyedi azonosító számot kell kapnia, és minden egyes állatot maradandóan meg kell jelölni ezzel a számmal tetoválás, mikrochip-beültetés vagy más megfelelő módszer segítségével.

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

19. A vizsgálathoz mindkét nemet fel kell használni. Megfelelő számú állatot kell használni az alapos biológiai és statisztikai értékelés lehetővé tétele érdekében. Éppen ezért minden egyes dóziscsoport és kísérő kontrollcsoport nemenként legalább 50 állatból kell álljon. A vizsgálat céljától függően a főbb becslések statisztikai ereje növelhető lehet az állatok különböző dóziscsoportokba történő egyenlőtlen elosztásával oly módon, hogy több mint 50 állatnak kell lennie az alacsony dózisú csoportokban, például az alacsony dózisok karcinogenitásának becslése céljából. Meg kell azonban jegyezni, hogy a csoport méretének mérsékelt növelése viszonylag kis mértékben növeli a vizsgálat statisztikai erejét. A vizsgálat statisztikai tervezéséről és a dózisszinteknek a statisztikai erő maximális szintre való növelése érdekében történő kiválasztásáról további információk a 116. iránymutatásban (7) találhatók.

Időközi elpusztítás és kísérő (jelző-) csoportok alkalmazásának előírása

20. Amennyiben ez tudományos szempontból indokolt, a vizsgálat a neoplasztikus elváltozások alakulására vonatkozó és mechanisztikai információk megszerzése céljából előírhatja az időközi elpusztítást, például a 12. hónapban. Abban az esetben, ha ilyen információk a vizsgált vegyi anyaggal végzett korábbi, ismételt adagolású toxicitási vizsgálatokból már rendelkezésre állnak, az időközi elpusztítás tudományos szempontból nem feltétlenül indokolt. Ha a vizsgálati terv időközi elpusztítást tartalmaz, az időközben elpusztítandó állatok száma minden egyes dóziscsoportban rendszerint nemenként 10, a vizsgálati tervben szereplő állatok teljes számát pedig annyival kell megnövelni, ahány állat elpusztítását tervezzük a vizsgálat befejezése előtt. Szükség szerint egy jelzőállatokból álló további (jellemzően nemenként 5 állatból álló) csoport is bevonható a betegség állapotának a vizsgálat közben történő megfigyelése céljából (30). További útmutatás a 116. iránymutatásban (7) található.

▼M4

Dóziscsoportok és adagolás

21. A dózis kiválasztásának és a dózisszintek felosztásának összes szempontjára vonatkozó útmutatás a 116. iránymutatásban található (7). Legalább három dózisszintet és egy ezzel párhuzamos kontrollt kell alkalmazni. A dózisszintek megválasztása általában a rövidebb távú ismételt adagolású vagy tartománybehatároló vizsgálatok eredményein alapul, figyelembe véve a vizsgált vegyi anyagra vagy rokon vegyi anyagokra vonatkozóan rendelkezésre álló bármilyen toxikológiai és toxikokinetikai adatot.

22. Ha a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai jellege vagy biológiai hatásai nem szabnak ennek korlátot, a legmagasabb dózisszintet olyan módon kell kiválasztani, hogy az alkalmas legyen az elsődleges célszervek és toxikus hatások meghatározására, ugyanakkor elkerülhető legyen a szenvedés, a súlyos toxicitás, a morbiditás vagy az elhullás. A 23. bekezdésben bemutatott tényezők figyelembevétele mellett a legmagasabb dózisszintet általában úgy kell megválasztani, hogy toxicitást váltson ki, amely például a testsúly növekedésének (körülbelül 10 %-os) visszaesésével bizonyítható. A vizsgálat célkitűzéseitől függően azonban (lásd a 6. bekezdést) a toxicitást bizonyíthatóan kiváltó dózisnál alacsonyabb maximális dózis is választható, például ha egy dózis káros hatást idéz elő, amely azonban csak kismértékben befolyásolja az élettartamot vagy a testsúlyt.

23. A dózisszintek és azok felosztása megválasztható úgy, hogy meghatározható legyen a dózis-válasz összefüggés, valamint a vizsgált vegyi anyag hatásmechanizmusától függően a NOAEL vagy a vizsgálat egyéb tervezett kimenetele, például a legalacsonyabb dózisszinten megfigyelhető BMD (lásd a 25. bekezdést). Az alacsonyabb dózis kiválasztása során figyelembe veendő tényezők többek között a dózis-válasz görbe várható meredeksége, azok a dózisok, amelyeknél fontos változások következhetnek be a metabolizmusban vagy a toxikus hatás mechanizmusában, amelyeknél küszöbérték várható, vagy amelyeknél az alacsony dózis extrapolálásához használható kiindulási pont várható.

24. A dózisszintek felosztásának kiválasztása függ a vizsgált vegyi anyag jellemzőitől, és nem írható elő a jelen vizsgálati módszerben, ugyanakkor csökkenő dózisszintek meghatározásához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása, az adagolások közötti nagyon nagy intervallumok (például körülbelül 6–10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazásával szemben pedig gyakran előnyben részesítendő egy negyedik vizsgálati csoport beiktatása. A 10-nél magasabb szorzófaktorokat általában kerülni kell, és használatukat meg kell indokolni.

25. A 116. iránymutatásban (7) részletesebben kifejtettek szerint a dózis kiválasztásakor figyelembe veendő szempontok többek között a következők:

— ismert vagy feltételezett nemlinearitások vagy elhajlási pontok a dózis-válasz görbén,

— toxikokinetika, valamint azok a dózistartományok, amelyek esetében a metabolikus indukció, a telítettség vagy a külső és belső dózisok közötti nemlinearitás előfordul, vagy nem fordul elő,

— prekurzor elváltozások, hatásmarkerek vagy a főbb mögöttes biológiai folyamatok működésének mutatói,

— a hatásmechanizmus főbb (vagy feltételezett) aspektusai, például azok a dózisok, amelyeknél megjelenik a citotoxicitás, felborulnak a hormonszintek és a homeoszatikus mechanizmusok stb.,

▼M4

— a dózis-válasz görbe azon területei, ahol különösen pontos becslés szükséges, például a várt BMD vagy egy feltételezett küszöbérték tartományában,

— a várható humán expozíciós szintek figyelembevétele.

26. Kontrollcsoportként egy kezeletlen csoport, vagy ha a vizsgált vegyi anyag beadásához vivőanyagot használunk, egy vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport alkalmazandó. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgált vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Vivőanyag alkalmazása esetén a kontrollcsoportban a vivőanyagot a dóziscsoportokban alkalmazott legnagyobb mennyiségben kell beadni. Ha a vizsgált vegyi anyagot a táplálékkal adjuk be, és emiatt a táplálékfogyasztás a táplálék lecsökkent ízletessége miatt jelentősen csökken, hasznos lehet egy párban etetett kontrollcsoport alkalmazása a megfelelőbb kontroll biztosítása érdekében.

A dózisok előkészítése és a vizsgált vegyi anyag beadása

27. A vizsgált vegyi anyagot általában orálisan, a takarmánnyal vagy az ivóvízzel, vagy gyomorszonda segítségével adjuk be. A bejuttatás útvonalára és módjára vonatkozó további információk a 116. iránymutatásban találhatók (7). A bejuttatás útvonala és módja függ a vizsgálat céljától, a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, biológiai hozzáférhetőségétől, valamint az emberi expozíció meghatározó útvonalától és módjától. A bejuttatás útvonalának és módjának kiválasztását indokolni kell. Állatjóléti okokból gyomorszonda rendszerint csak olyan hatóanyagoknál alkalmazandó, amelyek esetében a bejuttatásnak ez az útvonala és módja ésszerűen tükrözi a lehetséges humán expozíciót (például gyógyszerek esetében). A táplálékban vagy környezetben előforduló vegyi anyagok, többek között a növényvédő szerek esetében a beadás jellemzően a táplálékon vagy az ivóvízen keresztül történik. Néhány forgatókönyv, például a munkahelyi expozíció esetében ugyanakkor a beadás egyéb útvonalai megfelelőbbnek bizonyulhatnak.

28. A vizsgált vegyi anyagot szükség esetén feloldjuk vagy szuszpendáljuk alkalmas vivőanyagban. Adott esetben figyelembe kell venni a vivőanyag és más adalékanyagok következő tulajdonságait: a vizsgált vegyi anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára vagy visszamaradására gyakorolt hatások, a vizsgált vegyi anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt azon hatások, amelyek módosíthatják annak toxikus jellemzőit, valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások. Lehetőség szerint elsősorban vizes oldatot/szuszpenziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (például kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. A vizsgált vegyi anyag beadási körülmények közötti (például takarmánnyal történő beadás során fennálló) stabilitására és (adott esetben) a beadáshoz használt oldatok vagy takarmányok homogenitására vonatkozó információknak rendelkezésre kell állniuk.

29. A takarmánnyal vagy ivóvízzel adagolt vegyi anyagok esetében fontos biztosítani, hogy a vizsgált vegyi anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt vagy a vízháztartás egyensúlyát. A takarmánnyal történő beadást alkalmazó hosszú távú toxicitási vizsgálatok esetében a takarmányban lévő vizsgált vegyi anyag koncentrációja a kiegyensúlyozatlan táplálkozás elkerülése érdekében általában nem haladhatja meg a teljes takarmány 5 %-át. Ha a vizsgált vegyi anyagot a takarmányba keverve adjuk be, akkor vagy állandó takarmánykoncentráció (mg/takarmánykilogramm vagy ppm), vagy az állatok testsúlyára heti rendszerességgel kiszámított állandó dózisszint (mg/testsúlykilogramm) alkalmazható. A kiválasztott alternatívát meg kell nevezni.

▼M4

30. Orális úton történő beadás esetén a vizsgált vegyi anyagot naponta kell az állatoknak beadni (heti hét napon keresztül), rágcsálóknál általában 24 hónapon át (lásd még a 32. bekezdést). Bármely más adagolási rendszer – például heti öt napon történő beadás – használatát indokolni kell. Dermális úton történő beadás esetén az állatokat az e melléklet B.9. fejezetében (11) meghatározottak szerint általában legalább napi 6 órán keresztül, heti 7 napon kell a vizsgált vegyi anyaggal kezelni 24 hónapon át. Az inhaláció útján történő expozíciót napi 6 órán keresztül, heti 7 nap kell elvégezni, de indokolt esetben heti 5 napos expozíció is alkalmazható. Az expozíció időtartama általában 24 hónap. Patkányoktól eltérő rágcsálófajok csak orron át történő expozíciója esetén az expozíció maximális időtartama kiigazítható a fajspecifikus szorongás minimalizálása érdekében. A napi 6 óránál rövidebb expozíciós időtartam alkalmazását indokolni kell. Lásd még e melléklet B.8. fejezetét (9).

31. Ha a vizsgált vegyi anyagot szondán át adagoljuk, a dózist mindig a nap hasonló időszakában, gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át kell beadni az állatoknak. Általában egyetlen dózist kell beadni naponta egyszer; abban az esetben, ha a vegyi anyag például helyi irritációt okoz, a napi dózisarány fenntartható lehet elosztott (napi kétszeri) beadással. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. A mennyiséget a lehető legalacsonyabb szinten kell tartani, és rágcsálók esetében általában nem haladhatja meg az 1 ml/100 testsúlygramm térfogatot (31). A koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi dózisszinten konstans mennyiséget lehessen adagolni. A fentiek alól kivételt jelentenek az esetlegesen maró vagy irritatív hatást kiváltó anyagok, amelyeket hígítani kell a súlyos helyi hatások elkerülése érdekében. Kerülni kell az emésztőrendszerben valószínűsíthetően maró vagy irritatív hatást kiváltó koncentrációkkal történő vizsgálatokat.

A vizsgálat időtartama

32. A vizsgálat időtartama rágcsálók esetében általában 24 hónap, amely a felhasznált állatok normális élettartamának legnagyobb részére kiterjed. A vizsgált állattörzs élettartamától függően rövidebb vagy hosszabb vizsgálati időtartamok is alkalmazhatók, de ezt meg kell indokolni. Bizonyos egértörzsek, például az AKR/J, a C3H/J vagy a C57BL/6J törzs esetében a 18 hónapos időtartam megfelelőbb lehet. A következőkben iránymutatás olvasható a vizsgálat idejével és befejezésével, valamint a túléléssel kapcsolatban; további, többek között a negatív karcinogenitás túlélési arányhoz viszonyított elfogadhatóságának megfontolásával kapcsolatos útmutatás a krónikus toxicitási vizsgálatok és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok tervezésére és elvégzésére vonatkozó 116. OECD-iránymutatásban (7) található.

— Meg kell fontolni a vizsgálat befejezését, ha az életben maradt állatok száma az alacsonyabb dózissal kezelt csoportokban vagy a kontrollcsoportban 25 százalék alá csökken.

— Abban az esetben, ha csak a magas dózissal kezelt csoportban figyelhető meg idő előtti elhullás a toxicitás következtében, a vizsgálatot nem kell befejezni.

— Az életben maradt egyedek számát nemenként külön-külön kell figyelembe venni.

— A vizsgálat nem tarthat tovább annál a pontnál, amikor a vizsgálat révén nyert adatok már nem elegendőek a statisztikailag érvényes értékelés lefolytatásához.

▼M4

MEGFIGYELÉSEK

33. Rendszerint a nap elején és végén – beleértve a hétvégéket és az ünnepnapokat is – az összes állatot meg kell vizsgálni, hogy nem mutatja-e megbetegedés jeleit vagy nem hullott-e el. Ezen túlmenően az állatokat naponta egyszer meg kell vizsgálni, hogy mutatnak-e meghatározott, toxikológiai szempontból lényeges tüneteket, szondával történő adagolás esetén figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Külön figyelmet kell fordítani a daganatképződésre; minden, szemmel látható vagy kitapintható daganat megjelenésének idejét, helyét, méreteit, megjelenési formáját és növekedését fel kell jegyezni.

Testsúly, táplálék-/vízfogyasztás és táplálékhasznosítási képesség

34. A kezelés kezdetekor, az első 13 hét során legalább hetente egyszer, ezután pedig legalább havonta egyszer meg kell mérni az összes állat testsúlyát. A táplálékfogyasztást és a táplálékhasznosítási képességet a vizsgálat első 13 hetében legalább hetente, azt követően pedig legalább havonta egyszer kell mérni. Ha a vizsgált vegyi anyagot ivóvízzel adjuk be, a vízfogyasztást a vizsgálat első 13 hetében legalább hetente, azt követően pedig legalább havonta egyszer kell mérni. A vízfogyasztás mérését olyan vizsgálatok esetében is fontolóra kell venni, amelyek során az ivási szokások megváltoznak.

Hematológiai, klinikai biokémiai és egyéb mérések

35. A vizsgálatból nyerhető lehető legtöbb információ megszerzése érdekében – különösen a hatásmechanizmussal kapcsolatos szempontok meghatározása céljából – a vizsgálatvezető mérlegelése szerint vérminták vehetők a hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatokhoz. Vizeletelemzés elvégzése is célszerű lehet. Az ilyen minták karcinogenitási vizsgálat részeként történő levételének értékére vonatkozó további útmutatás a 116. iránymutatásban található (7). Amennyiben megfelelőnek ítéljük, a hematológiai és klinikai kémiai meghatározások céljából végzett vérvétel, valamint a vizeletelemzés valamelyik időközi elpusztítás (20. bekezdés) részeként, továbbá a vizsgálat befejezésekor végezhető el, nemenként és csoportonként legalább 10 állaton. Vérmintákat meghatározott helyről kell venni, például a szívből vagy a szemgolyó mögötti üregből altatás alatt, és adott esetben a megfelelő körülmények között kell tárolni. Vérkenet is készíthető vizsgálat céljára, különösen akkor, ha a csontvelő tűnik a célszervnek, bár az ilyen jellegű vizsgálatnak a karcinogén/onkogén hatás meghatározása szempontjából képviselt értéke megkérdőjelezhető (32).

PATOLÓGIA

Autopszia

36. A jelzőállatok (lásd a 20. bekezdést) és a kísérő csoportba tartozó többi állat kivételével a vizsgálatokba bevont összes állatot teljes körű, beható autopsziának kell alávetni, ideértve a következők alapos vizsgálatát: a test külső felszíne, az összes testnyílás, a koponya, a mellüreg, a hasüreg és ezek tartalma. A jelzőállatok és a kísérő csoportba tartozó többi állat esetében a vizsgálatvezető döntésétől függően eseti alapú boncolásra lehet szükség. A szervek súlyának mérése általában nem képezi a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok részét, mivel a geriátriai változások és – a későbbi szakaszokban – a tumorok kifejlődése zavaró tényezők lehetnek a szervek súlyával kapcsolatos adatok hasznosságát illetően. Ezek a mérések azonban kritikusak lehetnek az adatok bizonyító erejének mérlegelése során és különösen a hatásmechanizmussal kapcsolatos megfontolások tekintetében. Ha a szervek súlyának mérése kísérő vizsgálat részét képezi, a mérést legkésőbb a vizsgálat megkezdése után egy évvel el kell végezni.

▼**M4**

37. Az alábbi szöveteket a szövet típusa és a később elvégezni kívánt kórszövettani vizsgálat szempontjából legmegfelelőbb fixálóanyaggal kell tartósítani (33) (a szögletes zárójelben megadott szövetek megőrzése nem kötelező):

minden makroszkopikus elváltozás	szív	hasnyálmirigy	gyomor (előgyomor, mirigygyomor)
mellékvese	csípőbél	mellékpajzsmirigy	[fogazat]
aorta	éhbél	perifériás idegek	here
agy (beleértve a nagyagy, a kisagy és a nyúltvelő/nyúltagyi híd metszeteit)	vese	agyalapi mirigy	csecsemőmirigy
vakbél	könnymirigy (szemüregen kívüli)	prosztata	pajzsmirigy
méhnyak	máj	végbél	[nyelv]
koaguláló mirigy	tüdő	nyálmirigy	légcső
vastagbél	nyirokcsomók (felszíni és mély)	ondóhólyag	húgyhólyag
patkóbél	emlőmirigy (nőstényeknél kötelező, hímeknél csak ha láthatóan kimetszhető)	harántcsíkolt izom	méh (beleértve a méhnyakat)
mellékhere	[felső légutak, beleértve az orrot, az orrkagylókat és az orrmelléküregeket]	bőr	[húgyvezeték]
szem (beleértve a retinát)	nyelőcső	gerincvelő (három szinten: nyaki, mellkasi középső és ágyéki szakasz)	[húgycső]
[combcsont az ízületi felülettel együtt]	[szaglógumó]	lép	hüvely
epehólyag (patkánytól eltérő fajoknál)	petefészek	[szegycsont]	metszet a csontvelőből és/vagy egy friss, csontvelőből felszívott minta
Harder-mirigy			

Páros szervek, például vesék, mellékvesék esetében mind a két szervet tartósítani kell. A klinikai és más jellegű megfigyelések alapján további testszövetek vizsgálata is szükséges lehet. A fentieken túl meg kell őrizni minden olyan más szervet is, amely a vizsgált vegyi anyag ismert tulajdonságai alapján valószínűleg célszervnek tekinthető. A dermális úton történő bejuttatást alkalmazó vizsgálatok esetében az orális módon történő beadásnál felsorolt szerveket kell tartósítani, továbbá elengedhetetlen a bőrből történő mintavétel a beadás helyéről és e minta tartósítása. Inhalációs vizsgálatok esetében a légzőrendszerből származó tartósított és vizsgált szövetek felsorolásának követnie kell az e melléklet B.8. és B.29. fejezetében tett ajánlásokat. Egyéb szervek/szövetek esetében (valamint a légzőrendszerből származó tartósított szöveteken túl) az orális úton történő beadásnál felsorolt szerveket kell vizsgálni.

▼M4

Kórszövettani vizsgálatok

38. A toxikológiai patológiai vizsgálatok elvégzésének legjobb gyakorlatára vonatkozóan iránymutatás áll rendelkezésre (33). Legalább az alábbi szöveteket kell vizsgálni:

— a magas dózissal kezelt csoportból és a kontrollcsoportokból származó összes szövet,

— a vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított állatokból származó összes szövet,

— a makroszkopikus rendellenességeket, többek között tumorokat mutató összes szövet,

— azon szöveteket, amelyek a legnagyobb dózissal kezelt csoportnál a kezelésnek tulajdonítható kórszövettani elváltozásokat mutatnak, az összes többi dóziscsoport összes állatánál meg kell vizsgálni,

— páros szervek, például vesék, mellékvesék esetében mind a két szervet vizsgálni kell.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

39. Az összes értékelt paraméterre vonatkozó adatokat minden egyes állat esetében rögzíteni kell. Ezenfelül az összes adatot táblázat formájában összegezni kell, a vizsgált állatok minden csoportja tekintetében bemutatva, hogy hány egyeddel indult a vizsgálat, hány állat pusztult el, illetve hányat kellett elpusztítani humánus okokból a vizsgálat során, valamint az elpusztulás vagy humánus okokból való elpusztítás időpontját, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ideértve bármely toxikus hatás kezdetének idejét, időtartamát és súlyosságát, az elváltozásokat mutató állatok számát, az elváltozások típusát és az egyes elváltozástípusokat mutató állatok százalékos arányát. Az összegző adattáblázatoknak tartalmazniuk kell a toxikus hatásokat vagy elváltozásokat mutató állatokra vonatkozó átlagértékeket és szórásokat (folyamatos vizsgálati adatok esetében), valamint az elváltozások osztályozását.

40. A vizsgálat eredményeinek értékelése szempontjából hasznosak lehetnek a korábbi kontrolladatok, például abban az esetben, ha a párhuzamos kontrollokból származó adatok vélhetően lényegesen eltolódottak az ugyanabban a vizsgálati létesítményben/kolóniában lévő kontrollállatoktól származó újabb adatokhoz képest. Korábbi kontrolladatok elemzése esetén ugyanazon laboratórium által benyújtott, ugyanolyan korú és ugyanabba a törzsbe tartozó állatokra vonatkozó, az adott vizsgálatot megelőző öt évből származó adatokat kell felhasználni.

41. A számszerű eredményeket adott esetben megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazásával kell kiértékelni. A statisztikai módszereket és az elemezendő adatokat a vizsgálat tervezése során kell kiválasztani (9. bekezdés). A kiválasztás során szükség szerint elő kell írni a túlélésre vonatkozó kiigazításokat.

Vizsgálati jegyzőkönyv

42. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— fizikai jelleg, tisztaság, valamint fizikai és kémiai tulajdonságok,

— azonosító adatok,

▼M4

— a vegyi anyag származási helye,

— gyártási szám,

— kémiai elemzésről szóló tanúsítvány,

Vivőanyag (ha van):

— a vivőanyag kiválasztásának indokolása (ha az nem víz),

Kísérleti állatok:

— a felhasznált faj/törzs, és a választás indokolása,

— az állatok száma, életkora és neme a vizsgálat kezdetekor,

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.,

— az egyes állatok testsúlya a vizsgálat kezdetekor,

Vizsgálati körülmények:

— a beadási mód és a dózis kiválasztásának indokolása,

— az adatok elemzéséhez adott esetben használt statisztikai módszerek,

— a vizsgált vegyi anyag formulázására/a takarmány előkészítésére vonatkozó részletes adatok,

— a készítmény elért koncentrációjára, stabilitására és homogenitására vonatkozó analitikai adatok,

— a beadási mód és a vizsgált vegyi anyag bejuttatására vonatkozó részletes adatok,

— inhalációs vizsgálatok esetében információ arra vonatkozóan, hogy a bejuttatás csak orron vagy a teljes testfelületen keresztül történt-e,

— tényleges dózisok (mg/testsúlykilogramm/nap), valamint a vizsgált vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (mg/kg vagy ppm) a tényleges dózisra való átszámításhoz használt átszámítási tényező, ha ez alkalmazható,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok,

Eredmények (az adatok táblázatos összefoglalását és az egyes állatokra vonatkozó adatokat is meg kell adni)

Általános

— túlélési adatok,

— testsúly és annak változásai,

— takarmányfogyasztás, a táplálékhasznosítási képességgel kapcsolatos számítások, ha vannak, valamint vízfogyasztás, ha alkalmazható,

— toxikokinetikai adatok (ha rendelkezésre állnak),

— oftalmoszkópia (ha rendelkezésre áll),

— hematológia (ha rendelkezésre áll),

— klinikai kémia (ha rendelkezésre áll),

▼M4

Klinikai leletek

— toxicitási tünetek,

— az esetleges rendellenességek előfordulása (és – ha pontozzuk – azok súlyossága),

— a megfigyelt klinikai tünetek jellege, súlyossága és időtartama (átmeneti vagy állandó),

Boncolási adatok

— testsúly elpusztuláskor,

— szervek súlya és ezek aránya, ha alkalmazható,

— boncolási eredmények, rendellenességek előfordulása és súlyossága,

Kórszövettani vizsgálatok

— nem neoplasztikus kórszövettani leletek,

— neoplasztikus kórszövettani leletek,

— a makroszkopikus és mikroszkopikus vizsgálatok leletei közötti összefüggés,

— a kezeléssel összefüggő összes kórszövettani lelet részletes leírása, beleértve a súlyossági fokokat,

— a tárgylemezek szakértői felülvizsgálatáról szóló jelentés,

Az eredmények statisztikai feldolgozása, ha alkalmazható

Az eredmények tárgyalása, beleértve a következőket:

— az esetlegesen alkalmazott modellezési megközelítések tárgyalása,

— dózis-válasz összefüggések,

— korábbi kontrolladatok,

— a hatásmechanizmusra vonatkozó bármely információ figyelembevétele,

— BMD, NOAEL vagy LOAEL meghatározása,

— humán relevancia.

Következtetések

IRODALOM

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.

(5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

▼M4

(6) E melléklet B.27., Szubkrónikus orális toxicitási vizsgálat, 90 napos, ismételt adagolású orális toxicitási vizsgálat nem rágcsálókon című fejezete.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) E melléklet B.8., Szubakut inhalációs toxicitás: 28 napos vizsgálat című fejezete.

(10) E melléklet B.29., Szubkrónikus inhalációs toxicitás: 90 napos vizsgálat című fejezete.

(11) E melléklet B.9., Ismételt adagolású (28 napos) toxicitás (dermális) című fejezete.

(12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36: 793-801.

(13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

(19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to LIFE Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼**M4**

(22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S(2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International LIFE Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

(26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196-1203.

(27) Az Európai Parlament és a Tanács 2010. szeptember 22-i 2010/63/EU irányelve a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről, HL L 276., 2010.10.20., 33. o.

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(32) Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appéldául Toxicol. 29: 198-201.

(33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁS

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼M4

B.33. **A KRÓNIKUS TOXICITÁS ÉS A RÁKKELTŐ HATÁS EGYÜTTES VIZSGÁLATA**

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 453. vizsgálati iránymutatásában (2009) leírt módszerrel. Az eredeti 453. vizsgálati iránymutatást 1981-ben fogadták el. A jelen frissített B.33. vizsgálati módszer kidolgozását az állatjóllét és a szabályozási követelmények terén az elmúlt időszakban bekövetkezett változások figyelembevétele érdekében tartották szükségesnek (1) (2) (3) (4) (5). E B.33. vizsgálati módszer frissítése e melléklet B.32., A rákkeltő hatás vizsgálata című és B.30., Krónikus toxicitási vizsgálatok című fejezetének felülvizsgálatával párhuzamosan történt meg a vizsgálatban alkalmazott állatokra vonatkozó további információk megszerzése, valamint a dózis kiválasztásával kapcsolatos további részletek biztosítása céljából. A jelen vizsgálati módszer vegyi anyagok széles skálájának vizsgálatára szolgál, beleértve a növényvédő szereket és az ipari vegyszereket. Meg kell azonban jegyezni, hogy gyógyszeranyagok esetében néhány részlet és követelmény eltérő lehet (lásd: International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals).

2. A krónikus toxicitási vizsgálatok és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok többségét rágcsálófajokon végzik, ezért a jelen vizsgálati módszer elsősorban az e fajokon végzett vizsgálatokra alkalmazandó. Amennyiben az ilyen vizsgálatokat rágcsálóktól eltérő fajokon kell elvégezni, a megfelelő módosításokkal az itt vázolt elvek és eljárások is alkalmazhatók, az e melléklet B.27., 90 napos, ismételt adagolású orális toxicitási vizsgálat nem rágcsálókon című fejezetében (6) vázoltakkal együtt, a krónikus toxicitási vizsgálatok és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok tervezésére és elvégzésére vonatkozó 116. OECD-iránymutatásban leírtak szerint (7).

3. A krónikus toxicitási vizsgálatok, illetve a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során alkalmazott három fő beadási mód az orális, a dermális és az inhalációs. A beadási mód kiválasztása függ a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, valamint az emberi expozíció jellemző módjától. Az expozíciós mód kiválasztására vonatkozó további információk a 116. iránymutatásban találhatók (7).

4. A jelen vizsgálati módszer az orális expozíciós módra összpontosít, amely a krónikus toxicitási és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során a leggyakrabban alkalmazott mód. Az emberi egészségre jelentett kockázat értékeléséhez és/vagy bizonyos szabályozási rendszerek előírásai alapján dermális vagy inhalációs expozíciót alkalmazó, hosszú távú vizsgálatok elvégzésére is szükség lehet ugyan, azonban technikai szempontból e két expozíciós mód mindegyike igen összetett. Az ilyen vizsgálatokat eseti alapon kell megtervezni, bár az itt ismertetett, a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás orális beadás útján történő meghatározására és értékelésére szolgáló vizsgálati módszer a kezelési időszakokra, klinikai és patológiai paraméterekre stb. vonatkozó ajánlások tekintetében alapul szolgálhat az inhalációs és/vagy dermális vizsgálatokra vonatkozó protokollhoz. A vizsgált vegyi anyagok inhalációs (7) (8) és dermális (7) módon történő beadásával kapcsolatban OECD-iránymutatások állnak rendelkezésre. E melléklet B.8. (9) és B.29. fejezetét (10), valamint az akut inhalációs vizsgálatra vonatkozó OECD-iránymutatást (8) kifejezetten alkalmazni kell az inhalációs expozíciót alkalmazó, hosszabb távú vizsgálatok tervezése során. A dermális beadással végzett vizsgálatok esetében e melléklet B.9. fejezetét (11) kell alkalmazni.

▼M4

5. A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata információt szolgáltat az ismételt, a vizsgált fajok élettartamának akár egészére is kiterjedő expozícióból valószínűsíthetően fakadó egészségügyi kockázatokról. A vizsgálat információkkal szolgál a vizsgált vegyi anyag toxikus hatásairól, beleértve a lehetséges rákkeltő hatást, jelzi a célszerveket és a felhalmozódás lehetőségét. Becslést adhat a toxikus hatások észlelhető káros hatással nem járó szintjére, valamint a nem genotoxikus karcinogének esetében a tumorválaszra nézve, amely felhasználható az emberi expozícióra vonatkozó biztonsági kritériumok meghatározásához. Hangsúlyos szerepet kap az állatok lehető legtöbb információ megszerzése érdekében történő körültekintő klinikai vizsgálatának szükségessége is.

6. A jelen vizsgálati módszerben ismertetett, krónikus toxicitás, illetve rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok célkitűzései többek között a következők:

— a vizsgált vegyi anyag rákkeltő tulajdonságainak meghatározása, amelyek a párhuzamos kontrollcsoportokhoz viszonyítva megnövelik a neoplazmák gyakoriságát, megnövelik a rosszindulatú neoplazmák arányát vagy lerövidítik a neoplazmák megjelenéséhez szükséges időt,

— a neoplazmák megjelenési idejének meghatározása,

— a vizsgált vegyi anyag krónikus toxicitásának meghatározása,

— a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás célszervének (célszerveinek) meghatározása,

— a dózis-válasz összefüggés jellemzőinek meghatározása,

— a nem észlelhető káros hatás szintjének (NOAEL) vagy a benchmark-dózis (BMD) meghatározásához szükséges kiindulópontnak a meghatározása,

— a rákkeltő hatások extrapolálása az alacsony dózisú emberi expozíciós szintekre,

— a krónikus toxicitás hatásainak előrejelzése az emberi expozíciós szintek vonatkozásában,

— a hatásmechanizmusra vonatkozó hipotézisek vizsgálatához szükséges adatok biztosítása (2) (7) (12) (13) (14) (15).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

7. A vizsgált vegyi anyag potenciális rákkeltő hatásának és krónikus toxicitásának vizsgálata és értékelése során a vizsgálati laboratóriumnak a vizsgált vegyi anyagra vonatkozó összes rendelkezésre álló információt figyelembe kell vennie a vizsgálat megkezdését megelőzően annak érdekében, hogy a vizsgálati terv a vizsgált vegyi anyag toxikológiai tulajdonságainak hatékonyabb vizsgálatára összpontosítson, valamint hogy az állatkísérleteket minimálisra csökkentsük. A feltételezett karcinogén hatásmechanizmusára vonatkozó információk és a hatásmechanizmus figyelembevétele (2) (7) (12) (13) (14) (15) különösen fontos, mivel az optimális terv eltérő lehet attól függően, hogy a vizsgált vegyi anyag ismert vagy feltételezett genotoxikus karcinogén-e. A hatásmechanizmus figyelembevételére vonatkozó további útmutatás a 116. iránymutatásban szerepel (7).

8. A vizsgálat megtervezését segítő információk többek között a vizsgált vegyi anyag azonossága, kémiai szerkezete, valamint fizikai és kémiai tulajdonságai, a hatásmechanizmusra vonatkozó bármely információ, bármely *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálat eredményei, beleértve a genotoxicitási vizsgálatokéit, a várható felhasználási terület(ek) és az emberi expozíció lehetősége, a szerkezetileg rokon vegyi anyagok rendelkezésre álló (Q)SAR-adatai,

▼M4

mutagenitásra/genotoxicitásra, rákkeltő hatásra vonatkozó és egyéb toxikológiai adatai, a rendelkezésre álló toxikokinetikai adatok (egyszeri dózisra és lehetőség szerint ismételt dózisra vonatkozó kinetikai adatok), valamint egyéb ismételt expozíciós vizsgálatokból származó adatok. A krónikus toxicitást/rákkeltő hatás meghatározása csak a toxicitásra vonatkozó, 28 napos vagy 90 napos ismételt dózisú toxicitási vizsgálatokból származó kezdeti információk megszerzését követően végzendő el. A rák előidézésére, illetve elősegítésére vonatkozó rövid távú vizsgálatok szintén hasznos információkat szolgáltathatnak. Az adott vizsgált vegyi anyag lehetséges egészségkárosító hatásai átfogó vizsgálatának részeként a rákkeltő hatás vizsgálatának fokozatos megközelítését kell megfontolni (16) (17) (18) (19).

9. Az eredmények elemzése szempontjából legmegfelelőbb statisztikai módszereket az adott kísérleti tervre és célkitűzésekre tekintettel a vizsgálat kezdetét megelőzően kell meghatározni. A megfontolandó kérdések közé tartozik, hogy tartalmazzanak-e a statisztikák a túléléssel kapcsolatos kiigazítást, a kumulatív tumorkockázat túlélési időtartamhoz viszonyított elemzését, a tumor kialakulási idejének elemzését, valamint egy vagy több csoport idő előtti megszüntetése esetén végzett elemzést. A megfelelő statisztikai elemzésekre vonatkozó útmutatást, továbbá a nemzetközileg elfogadott statisztikai módszerekre vonatkozó főbb hivatkozásokat a 116. iránymutatás (7), valamint a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok elemzésével és értékelésével kapcsolatos 35. iránymutatás (20) tartalmazza.

10. A rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok elvégzése során a klinikai tünetek mint a biztonsági értékeléshez használt kísérleti állatok humánus végpontjai felismeréséről, értékeléséről és használatáról szóló OECD-iránymutatásban (21), különösen annak 62. bekezdésében ismertetett vezérelveket és szempontokat minden esetben követni kell. E bekezdés szerint: „*Ha az ismételt adagolást alkalmazó vizsgálatok során egy állat progresszív, az állapot további romlásához vezető klinikai tüneteket mutat, tájékozott döntést kell hozni az állat humánus elpusztítására vonatkozóan. A döntéshozatal során mérlegelni kell az állat vizsgálatának folytatása révén szerezhető információk értékét az állat általános állapotához viszonyítva. Ha úgy döntünk, hogy az állatot továbbra is vizsgálni kell, a megfigyelések gyakoriságát szükség szerint növelni kell. Ha ez nem befolyásolja hátrányosan a vizsgálat céljának elérését, lehetséges az adagolás átmeneti szüneteltetése – ha ez csökkenti a fájdalmat vagy a szorongást – vagy a vizsgálati dózis csökkentése.*”

11. A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során alkalmazott dózisok kiválasztásnak elveire vonatkozó részletes útmutatás és ezen elvek leírása a 116. iránymutatásban (7), valamint a Nemzetközi Élettudományi Intézet két kiadványában található (22) (23). A fő dózis-kiválasztási stratégia a vizsgálat elsődleges célkitűzésétől vagy célkitűzéseitől függ (6. bekezdés). A megfelelő dózisszintek kiválasztásakor egyensúlyt kell találni egyfelől a veszélyesség vizsgálata, másfelől az alacsony dózisra adott válaszok jellemzése és azok relevanciája között. Ez különösen lényeges a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata esetében.

12. Meg kell fontolni a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálatának elvégzését a krónikus toxicitási vizsgálat (e melléklet B.30. fejezete) és a rákkeltő hatás vizsgálatának (e melléklet B.32. fejezete) külön-külön történő elvégzése helyett. A két külön vizsgálat elvégzéséhez viszonyítva az együttes vizsgálat idő- és költséghatékonyabb, valamint a használt állatok számának némi csökkenésével jár, anélkül hogy befolyásolná az adatok minőségét a krónikus fázisban vagy a karcinogenitási fázisban. A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata során azonban körültekintően figyelembe kell venni a dóziskiválasztás elveit (11. és 22–26. bekezdés), továbbá azt is meg kell jegyezni, hogy bizonyos szabályozási keretrendszerek a vizsgálatok különkülön történő elvégzését írhatják elő. A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálatának oly módon történő megtervezésére vonatkozóan, hogy az állatok száma csökkentésének lehetősége szempontjából és a különböző kísérleti eljárások egyszerűsítése révén elérhető legyen a vizsgálat maximális hatékonysága, a 116. iránymutatás (7) tartalmaz további útmutatást.

▼M4

13. A jelen vizsgálati módszerrel összefüggésében használt fogalmak meghatározása a jelen fejezet végén és a 116. iránymutatásban található (7).

A VIZSGÁLAT ELVE

14. A vizsgálati terv két párhuzamos fázist tartalmaz: egy krónikus fázist és egy rákkeltő fázist (az időtartamot lásd a 34. és a 35. bekezdésben). A vizsgált vegyi anyagot általában orális úton juttatjuk be, azonban az inhalációs vagy dermális bejuttatással történő vizsgálat is megfelelő lehet. A krónikus fázis esetében a vizsgált vegyi anyagot naponta adjuk be fokozatos dózisokban a kísérleti állatok több csoportjának, csoportonként egy dózisszintet alkalmazva, általában 12 hónapig, bár hosszabb és rövidebb időtartam is választható a szabályozási követelményektől függően (lásd a 34. bekezdést). A kiválasztott időtartamnak elég hosszúnak kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye a kumulatív toxicitás esetleges hatásainak megjelenését a geriátriai változások zavaró hatásai nélkül. A vizsgálati terv egy vagy több időközi elpusztítást is tartalmazhat, például a 3. és a 6. hónapot követően, és állatok további csoportjai vonhatók be ennek kiegyenlítése érdekében (lásd a 20. bekezdést). A rákkeltő fázis esetében a vizsgált vegyi anyagot naponta adjuk be a vizsgált állatok több csoportjának az élettartamuk jelentős részén keresztül. Az állatokat mindkét fázisban gondosan megfigyeljük a toxicitás jeleinek és a neoplasztikus elváltozások kialakulásának észlelése érdekében. A vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított állatokat felboncoljuk, továbbá a vizsgálat befejezése után az életben maradt állatokat is elpusztítjuk és felboncoljuk.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

15. A jelen vizsgálati módszer elsősorban a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás rágcsálókban történő vizsgálatával és értékelésével foglalkozik (2. bekezdés). A rágcsálóktól eltérő fajok használata fontolóra vehető, ha a rendelkezésre álló adatok arra utalnak, hogy az ilyen fajok relevánsabbak az emberekre gyakorolt egészségi hatások előrejelzése tekintetében. A faj kiválasztását indokolni kell. Az előnyben részesítendő rágcsálófaj a patkány, de más rágcsálófaj, például az egér is használható. Habár az egér használatának hasznossága a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során korlátozott lehet (24) (25) (26), néhány jelenlegi szabályozási program megköveteli a rákkeltő hatás egereken történő vizsgálatát, hacsak nem nyert megállapítást, hogy az ilyen vizsgálat tudományos szempontból nem szükséges. A patkányok és az egerek a viszonylag rövid élettartamuk, gyógyszerészeti és toxikológiai vizsgálatokban elterjedt használatuk, a tumorindukcióra való fogékonyságuk, valamint a megfelelően jellemzett törzsek rendelkezésre állása miatt preferált kísérleti modellek. E tulajdonságok eredményeképpen nagy mennyiségű információ áll rendelkezésre fiziológiájukról és patológiájukról. A rágcsálótól eltérő fajokon történő, krónikus toxicitás/rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok tervezésének és elvégzésének adott esetben a jelen vizsgálati módszerben ismertetett elveken, valamint az e melléklet B.27., 90 napos, ismételt adagolású orális toxicitási vizsgálat nem rágcsálókon című fejezetében (6) leírtakon kell alapulnia. A faj és törzs kiválasztására vonatkozó további információk a 116. iránymutatásban találhatók (7).

16. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal, ivarérett állatokat kell alkalmazni. A krónikus toxicitás/rákkeltő hatás együttes vizsgálatát olyan állatokon kell elvégezni, amelyek törzse és eredete megegyezik a rövidebb időtartamú előzetes toxicitási vizsgálat(ok)ban felhasznált állatokéval, habár ha ismert, hogy az ehhez a törzshöz tartozó és ilyen eredetű állatoknál problémák jelentkeznek a hosszú távú vizsgálatok esetében általánosan elfogadott túlélési szempontok teljesítése tekintetében (lásd a 116. iránymutatást (7)), fontolóra kell venni egy, a hosszú távú vizsgálatok esetében elfogadható túlélési aránnyal rendelkező állattörzs használatát. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek.

▼M4

Tartási és etetési körülmények

17. Az állatokat külön, vagy azonos nemű egyedekből álló kis csoportokban kell tartani; a külön történő tartást csak akkor kell fontolóra venni, ha az tudományos szempontból indokolt (27) (28) (29). A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezésének lehetséges hatásait. A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérséklete 22 °C (± 3 °C) kell, hogy legyen. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem szabad meghaladnia a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez hagyományos laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmánynak meg kell felelnie a vizsgált faj összes tápanyagigényének, és a vizsgálat eredményét esetlegesen befolyásoló takarmány-szennyeződések mennyiségének – beleértve többek között a növényvédőszer-maradványokat, a perzisztens szerves szennyező anyagokat, a fitoösztrogéneket, a nehézfémeket és a mikotoxinokat – a lehető legalacsonyabbnak kell lennie. A tápanyagokban és takarmányokban lévő szennyező anyagok szintjére vonatkozó analitikai információkat időszakos jelleggel kell meghatározni, legalább a vizsgálat kezdetekor, valamint amikor változás következik be a felhasznált adagban, és ezeket az információkat a zárójelentésben közölni kell. A vizsgálat során felhasznált ivóvízre vonatkozó analitikai információkat hasonló módon kell megadni. A vizsgált vegyi anyag táplálékkal történő beadása esetén a takarmány megválasztását befolyásolhatja annak szükségessége, hogy az megfelelően keveredjen el a takarmánnyal és kielégítse az állatok táplálkozási igényeit.

Az állatok előkészítése

18. A laboratóriumi körülményekhez legalább 7 napig szoktatott, egészséges állatokat kell használni, amelyek korábban nem voltak kitéve kísérleti eljárásoknak. Rágcsálók esetében az állatoknak történő adagolást az elválasztást és szoktatást követően a lehető leghamarabb, és lehetőleg az állatok 8 hetes kora előtt meg kell kezdeni. A kísérleti állatokat faj, törzs, eredet, nem, súly és életkor szerint kell jellemezni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya az egyes nemeken belül csak minimálisan térhet el egymástól, a vizsgálatban használt összes állat súlyának átlagos értékétől pedig legfeljebb ± 20 %-kal különbözhet mindkét nem esetében. Az állatokat véletlenszerűen kell besorolni a kontroll- és kezelt csoportokba. A véletlenszerű kiválasztást követően nem lehet lényeges különbség az egyes nemeken belül a csoportok átlagos testsúlya között. Ha statisztikailag szignifikáns különbségek fordulnak elő, a véletlenszerű kiválasztás lépését lehetőség szerint meg kell ismételni. Minden egyes állatnak egyedi azonosító számot kell kapnia, és minden egyes állatot maradandóan meg kell jelölni ezzel a számmal tetoválás, mikrochip-beültetés vagy más megfelelő módszer segítségével.

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

19. A vizsgálathoz mindkét nemet fel kell használni. Megfelelő számú állatot kell használni az alapos biológiai és statisztikai értékelés lehetővé tétele érdekében. Rágcsálók esetében ezért a vizsgálat karcinogenitási fázisára szánt minden egyes dóziscsoport (a 22. bekezdésben leírtak szerint) és kísérő kontrollcsoport nemenként legalább 50 állatból kell álljon. A vizsgálat céljától függően a főbb becslések statisztikai ereje növelhető lehet az állatok különböző dóziscsoportokba történő egyenlőtlen elosztásával oly módon, hogy több mint 50 állatnak kell lennie az alacsony dózisú csoportokban, például az alacsony dózisok karcinogenitásának becslése céljából. Meg kell azonban jegyezni, hogy a csoport méretének mérsékelt növelése viszonylag kis mértékben növeli a vizsgálat statisztikai erejét. Rágcsálók esetében a vizsgálat krónikus toxicitási fázisára szánt minden egyes dóziscsoport (a 22. bekezdésben leírtak szerint) és kísérő kontrollcsoport nemenként legalább

▼M4

10 állatból kell álljon. Meg kell jegyezni, hogy ez a szám alacsonyabb, mint a krónikus toxicitási vizsgálatnál (e melléklet B.30. fejezete). Az együttes vizsgálat krónikus toxicitási fázisában vizsgált, csoportonként kisebb számú állattól származó adatok értelmezését ugyanakkor a vizsgálat karcinogenitási fázisában vizsgált, nagyobb számú állattól származó adatokkal lehet alátámasztani. Az egerekkel végzett vizsgálatok esetében a krónikus toxicitási fázisban további állatok bevonása lehet szükséges minden egyes dóziscsoportban az összes előírt hematológiai meghatározás elvégzése céljából. A vizsgálat statisztikai tervezéséről és a dózisszinteknek a statisztikai erő maximális szintre való növelése érdekében történő kiválasztásáról további információk a 116. iránymutatásban (7) találhatók.

Időközi elpusztításra, kísérő csoportra és jelzőállatokra vonatkozó rendelkezések

20. Amennyiben ez tudományos szempontból indokolt, a vizsgálat a nem neoplasztikus elváltozások alakulására vonatkozó és mechanisztikai információk megszerzése céljából előírhatja az időközi elpusztítást, például a krónikus toxicitási fázis esetén a 6. hónapban. Abban az esetben, ha ilyen információk a vizsgált vegyi anyaggal végzett korábbi, ismételt adagolású toxicitási vizsgálatokból már rendelkezésre állnak, az időközi elpusztítás tudományos szempontból nem feltétlenül indokolt. A vizsgálat krónikus toxicitási fázisában általában 12 hónapon keresztül használt állatok (34. bekezdés) időközi elpusztítással kapcsolatos adatokat szolgáltatnak a vizsgálat karcinogenitási fázisához, ezzel csökkentve az összesen felhasznált állatok számát. Kísérő csoportok is bevonhatók a vizsgálat krónikus toxicitási fázisába a vizsgált vegyi anyag által esetlegesen okozott toxikológiai változások visszafordíthatóságának megfigyelése céljából. E csoportok vizsgálata korlátozódhat a vizsgálat legnagyobb dózisával való kezelésre és kontrollvizsgálatra. Szükség szerint egy jelzőállatokból álló további (jellemzően nemenként 5 állatból álló) csoport is bevonható a betegség állapotának a vizsgálat közben történő megfigyelése céljából (30). A vizsgálat időközi elpusztításokat, kísérő csoportokat és jelzőállatokat magában foglaló, és egyúttal az összesen felhasznált állatok számát minimálisra csökkentő megtervezésével kapcsolatban a 116. iránymutatásban (7) található további útmutatás.

21. Ha a vizsgálati terv kísérő csoportot és/vagy időközi elpusztítást tartalmaz, az erre a célra bevont állatok száma rendszerint minden egyes dóziscsoportban nemenként 10, a vizsgálati tervben szereplő állatok teljes számát pedig annyival kell megnövelni, ahány állat elpusztítását tervezzük a vizsgálat befejezése előtt. Az időközben elpusztított és a kísérő csoportban lévő állatokat általában ugyanazoknak a megfigyeléseknek kell alávetni, mint a fő vizsgálat krónikus toxicitási fázisában vizsgált állatokat, beleértve a testsúlyra, táplálék-/vízfogyasztásra, hematológiára és klinikai kémiára vonatkozó méréseket, valamint patológiai vizsgálatokat, de előírható (az időközi elpusztítás céljából bevont csoportoknál), hogy a mérések csak bizonyos főbb paraméterekre, például a neurotoxicitásra vagy az immuntoxicitásra korlátozódjanak.

Dóziscsoportok és adagolás

22. A dózis kiválasztásának és a dózisszintek felosztásának összes szempontjára vonatkozó útmutatás a 116. iránymutatásban található (7). Legalább három dózisszintet és egy ezzel párhuzamos kontrollt kell alkalmazni, a krónikus és a karcinogenitási fázishoz egyaránt. A dózisszintek megválasztása általában a rövidebb távú ismételt adagolású vagy tartománybehatároló vizsgálatok eredményein alapul, figyelembe véve a vizsgált vegyi anyagra vagy rokon vegyi anyagokra vonatkozóan rendelkezésre álló bármilyen toxikológiai és toxikokinetikai adatot.

▼M4

23. A vizsgálat krónikus toxicitási fázisa esetében a három dózisszintet alkalmazó teljes vizsgálat nem feltétlenül szükséges, ha előre jelezhető, hogy az egyetlen, legalább 1 000 mg/testsúlykilogramm/nap dózisnak megfelelő dózisszinttel végzett vizsgálat valószínűleg nem okoz kedvezőtlen hatásokat. Ennek az előrejelzésnek előzetes vizsgálatokból származó információkon, valamint azon a megfontoláson kell alapulnia, hogy a szerkezetileg rokon anyagokkal kapcsolatos adatok alapján nem várható toxicitás. 1 000 mg/testsúlykilogramm/nap határadag alkalmazható, kivéve, ha a humán expozíció magasabb dózisszint használatát indokolja.

24. Ha a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai jellege vagy biológiai hatásai nem szabnak ennek korlátot, a legmagasabb dózisszintet olyan módon kell kiválasztani, hogy az alkalmas legyen az elsődleges célszervek és toxikus hatások meghatározására, ugyanakkor elkerülhető legyen a szenvedés, a súlyos toxicitás, a morbiditás vagy az elhullás. A legmagasabb dózisszintet általában úgy kell megválasztani, hogy toxicitást váltson ki, amely például a testsúly növekedésének (körülbelül 10 %-os) visszaesésével bizonyítható. A vizsgálat célkitűzéseitől függően azonban (lásd a 6. bekezdést) a toxicitást bizonyíthatóan kiváltó dózisnál alacsonyabb maximális dózis is választható, például ha egy dózis káros hatást idéz elő, amely azonban csak kismértékben befolyásolja az élettartamot vagy a testsúlyt.

25. A dózisszintek és azok felosztása megválasztható úgy, hogy meghatározható legyen a dózis-válasz összefüggés, valamint a vizsgált vegyi anyag hatásmechanizmusától függően a NOAEL vagy a vizsgálat egyéb tervezett kimenetele, például a BMD (lásd a 27. bekezdést). Az alacsonyabb dózis kiválasztása során figyelembe veendő tényezők többek között a dózis-válasz görbe várható meredeksége, azok a dózisok, amelyeknél fontos változások következhetnek be a metabolizmusban vagy a toxikus hatás mechanizmusában, amelyeknél küszöbérték várható, vagy amelyeknél az alacsony dózis extrapolálásához használható kiindulási pont várható. A rákkeltő hatás/krónikus toxicitás együttes vizsgálatának elsődleges célja a karcinogenitási kockázatértékelést szolgáló információk megszerzése, a krónikus toxicitásra vonatkozó információk megszerzése pedig rendszerint másodlagos cél. Ezt szem előtt kell tartani a vizsgálat dózisszintjeinek és a dózisszintek felosztásának kiválasztásakor.

26. A dózisszintek felosztásának kiválasztása függ a vizsgálat célkitűzéseitől és a vizsgált vegyi anyag jellemzőitől, és nem írható elő részletesen a jelen vizsgálati módszerben, ugyanakkor csökkenő dózisszintek meghatározásához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása, az adagolások közötti nagyon nagy intervallumok (például körülbelül 6–10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazásával szemben pedig gyakran előnyben részesítendő egy negyedik vizsgálati csoport beiktatása. A 10-nél magasabb szorzófaktorokat általában kerülni kell, és használatukat meg kell indokolni.

27. A 116. iránymutatásban részletesebben leírtak szerint (7) a dózis kiválasztásakor figyelembe veendő szempontok többek között a következők:

— ismert vagy feltételezett nemlinearitások vagy elhajlási pontok a dózis-válasz görbén,

— toxikokinetika, valamint azok a dózistartományok, amelyek esetében a metabolikus indukció, a telítettség vagy a külső és belső dózisok közötti nemlinearitás előfordul, vagy nem fordul elő,

— prekurzor elváltozások, hatásmarkerek vagy a főbb mögöttes biológiai folyamatok működésének mutatói,

▼M4

— a hatásmechanizmus főbb (vagy feltételezett) aspektusai, például azok a dózisok, amelyeknél megjelenik a citotoxicitás, felborulnak a hormonszintek és a homeoszatikus mechanizmusok stb.,

— a dózis-válasz görbe azon területei, ahol különösen pontos becslés szükséges, például a várt BMD vagy egy feltételezett küszöbérték tartományában,

— a várható humán expozíciós szintek figyelembevétele, különösen a közepes és alacsony dózis kiválasztása során.

28. Kontrollcsoportként egy kezeletlen csoport, vagy ha a vizsgált vegyi anyag beadásához vivőanyagot használunk, egy vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport alkalmazandó. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgált vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Vivőanyag alkalmazása esetén a kontrollcsoportban a vivőanyagot a dóziscsoportokban alkalmazott legnagyobb mennyiségben kell beadni. Ha a vizsgált vegyi anyagot a táplálékkal adjuk be, és emiatt a táplálékfogyasztás a táplálék lecsökkent ízletessége miatt jelentősen csökken, hasznos lehet egy párban etetett kontrollcsoport alkalmazása a megfelelőbb kontroll biztosítása érdekében.

A dózisok előkészítése és a vizsgált vegyi anyag beadása

29. A vizsgált vegyi anyagot általában orálisan, a takarmánnyal vagy az ivóvízzel, vagy gyomorszonda segítségével adjuk be. A bejuttatás útvonalára és módjára vonatkozó további információk a 116. iránymutatásban találhatók (7). A bejuttatás útvonala és módja függ a vizsgálat céljától, a vizsgált vegyi anyag fizikai/kémiai tulajdonságaitól, biológiai hozzáférhetőségétől, valamint az emberi expozíció meghatározó útvonalától és módjától. A bejuttatás útvonalának és módjának kiválasztását indokolni kell. Állatjóléti okokból gyomorszonda rendszerint csak olyan hatóanyagoknál alkalmazandó, amelyek esetében a bejuttatásnak ez az útvonala és módja ésszerűen tükrözi a lehetséges humán expozíciót (például gyógyszerek esetében). A táplálékban vagy környezetben előforduló vegyi anyagok, többek között a növényvédő szerek esetében a beadás jellemzően a táplálékon vagy az ivóvízen keresztül történik. Néhány forgatókönyv, például a munkahelyi expozíció esetében ugyanakkor a beadás egyéb útvonalai megfelelőbbnek bizonyulhatnak.

30. A vizsgált vegyi anyagot szükség esetén feloldjuk vagy szuszpendáljuk alkalmas vivőanyagban. Adott esetben figyelembe kell venni a vivőanyag és más adalékanyagok következő tulajdonságait: a vizsgált vegyi anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára vagy visszamaradására gyakorolt hatások, a vizsgált vegyi anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt azon hatások, amelyek módosíthatják annak toxikus jellemzőit, valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások. Lehetőség szerint elsősorban vizes oldatot/szuszpenziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (például kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. A vizsgált vegyi anyag beadási körülmények közötti (például takarmánnyal történő beadás során fennálló) stabilitására és (adott esetben) a beadáshoz használt oldatok vagy takarmányok homogenitására vonatkozó információknak rendelkezésre kell állniuk.

31. A takarmánnyal vagy ivóvízzel adagolt vegyi anyagok esetében fontos biztosítani, hogy a vizsgált vegyi anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt vagy a vízháztartás egyensúlyát. A takarmánnyal történő beadást alkalmazó hosszú távú toxicitási vizsgálatok esetében a takarmányban lévő vizsgált vegyi anyag koncentrációja a kiegyensúlyozatlan táplálkozás elkerülése érdekében általában nem haladhatja meg a teljes takarmány 5 %-át. Ha a vizsgált vegyi anyagot a takarmányba keverve adjuk be, akkor vagy állandó takarmánykoncentráció (mg/takarmánykilogramm vagy ppm), vagy az állatok testsúlyára heti rendszerességgel kiszámított állandó dózisszint (mg/testsúlykilogramm) alkalmazható. A kiválasztott alternatívát meg kell nevezni.

▼M4

32. Orális úton történő beadás esetén a vizsgált vegyi anyagot naponta kell az állatoknak beadni (heti hét napon keresztül) 12 hónapon (krónikus toxicitási fázis) vagy 24 hónapon át (karcinogenitási fázis), lásd még a 33. és a 34. bekezdést. Bármely más adagolási rendszer – például heti öt napon történő beadás – használatát indokolni kell. Dermális úton történő beadás esetén az állatokat az e melléklet B.9. fejezetében meghatározottak szerint általában legalább napi 6 órán keresztül, heti 7 napon kell a vizsgált vegyi anyaggal kezelni 12 hónapon (krónikus toxicitási fázis) vagy 24 hónapon át (karcinogenitási fázis). Az inhaláció útján történő expozíciót napi 6 órán keresztül, heti 7 nap kell elvégezni, de indokolt esetben heti 5 napos expozíció is alkalmazható. Az expozíció időtartama általában 12 hónap (krónikus toxicitási fázis) vagy 24 hónap (karcinogenitási fázis). Patkányoktól eltérő rágcsálófajok csak orron át történő expozíciója esetén az expozíció maximális időtartama kiigazítható a fajspecifikus szorongás minimalizálása érdekében. A napi 6 óránál rövidebb expozíciós időtartam alkalmazását indokolni kell. Lásd még e melléklet B.8. fejezetét (9).

33. Ha a vizsgált vegyi anyagot szondán át adagoljuk, a dózist mindig a nap hasonló időszakában, gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át kell beadni az állatoknak. Általában egyetlen dózist kell beadni naponta egyszer; abban az esetben, ha a vegyi anyag például helyi irritációt okoz, a napi dózisarány fenntartható lehet elosztott (napi kétszeri) beadással. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. A mennyiséget a lehető legalacsonyabb szinten kell tartani, és rágcsálók esetében általában nem haladhatja meg az 1 ml/100 testsúlygramm térfogatot (31). A koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi dózisszinten konstans mennyiséget lehessen adagolni. A fentiek alól kivételt jelentenek az esetlegesen maró vagy irritatív hatást kiváltó anyagok, amelyeket hígítani kell a súlyos helyi hatások elkerülése érdekében. Kerülni kell az emésztőrendszerben valószínűsíthetően maró vagy irritatív hatást kiváltó koncentrációkkal történő vizsgálatokat.

A vizsgálat időtartama

34. Az adagolási időszak és a vizsgálat krónikus toxicitási fázisának időtartama általában 12 hónap, bár a vizsgálati terv az adott szabályozási rendszer követelményeitől vagy bizonyos mechanisztikai céloktól függően lehetővé teszi a rövidebb (például 6 vagy 9 hónapos) vagy hosszabb (például 18 vagy 24 hónapos) időtartamú vizsgálatokat, illetve alkalmazható ilyen időtartamú vizsgálatok során is. A 12 hónapos expozíciós időtartamtól való eltérést indokolni kell, különösen a rövidebb időtartamok esetében. Az ehhez a fázishoz hozzárendelt összes dóziscsoportot a krónikus toxicitás értékelése és a nem neoplasztikus patológiai vizsgálatok céljából meg kell szüntetni a meghatározott időpontban. A vizsgált vegyi anyag által esetlegesen okozott toxikológiai változások visszafordíthatóságának megfigyelése céljából bevont kísérő csoportokat az expozíció megszüntetését követően legalább 4 hétig, de legfeljebb a vizsgálat teljes időtartamának egyharmadáig fenn kell tartani adagolás nélkül.

35. A vizsgálat karcinogenitási fázisának időtartama rágcsálók esetében általában 24 hónap, amely a felhasznált állatok normális élettartamának legnagyobb részére kiterjed. A vizsgált állattörzs élettartamától függően rövidebb vagy hosszabb vizsgálati időtartamok is alkalmazhatók, de ezt meg kell indokolni. Bizonyos egértörzsek, például az AKR/J, a C3H/J vagy a C57BL/6J törzs esetében a 18 hónapos időtartam megfelelőbb lehet. A következőkben iránymutatás olvasható a vizsgálat idejével és befejezésével, valamint a túléléssel kapcsolatban; további, többek között a negatív karcinogenitás túlélési arányhoz viszonyított elfogadhatóságának megfontolásával kapcsolatos útmutatás a 116. iránymutatásban (7) található:

▼M4

— Meg kell fontolni a vizsgálat befejezését, ha az életben maradt állatok száma az alacsonyabb dózissal kezelt csoportokban vagy a kontrollcsoportban 25 százalék alá csökken.

— Abban az esetben, ha csak a magas dózissal kezelt csoportban figyelhető meg idő előtti elhullás a toxicitás következtében, a vizsgálatot nem kell befejezni.

— Az életben maradt egyedek számát nemenként külön-külön kell figyelembe venni.

— A vizsgálat nem tarthat tovább annál a pontnál, amikor a vizsgálat révén nyert adatok már nem elegendőek a statisztikailag érvényes értékelés lefolytatásához.

MEGFIGYELÉSEK (KRÓNIKUS TOXICITÁSI FÁZIS)

36. Rendszerint a nap elején és végén – beleértve a hétvégéket és az ünnepnapokat is – az összes állatot meg kell vizsgálni, hogy nem mutatja-e megbetegedés jeleit vagy nem hullott-e el. Általános klinikai megfigyelést naponta legalább egyszer kell végezni, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban, szondával történő adagolás esetén figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát.

37. Az első expozíció előtt legalább egyszer (az egyedek közötti összehasonlítás érdekében), a vizsgálat első hetének végén, azt követően pedig havonta egyszer az összes állatot részletes klinikai megfigyeléseknek kell alávetni. A megfigyelési protokollt úgy kell kialakítani, hogy az egyes megfigyelők közötti különbségek minimálisak legyenek, és függetlenek legyenek a vizsgált csoportoktól. E megfigyeléseket az állatok tartására egyébként használt ketreceken kívül, lehetőleg egy szabványos karámban, minden alkalommal a nap hasonló időszakában kell elvégezni. A megfigyeléseket gondosan fel kell jegyezni, lehetőleg a vizsgálatokat végző laboratórium által kifejezetten meghatározott pontozásos rendszer segítségével. Törekedni kell arra, hogy a megfigyelési körülmények közötti különbségek minimálisak legyenek. A feljegyzett észleléseknek ki kell terjedniük többek között a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapota, a váladékok és kiválasztott anyagok előfordulása, valamint az autonóm aktivitás (például könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupillaméret, szokatlan légzési ritmusok) tekintetében megfigyelhető változásokra. A járás, a testtartás és a kézbevételre adott reakció megváltozását, valamint a klónusos vagy tónusos görcsök, sztereotip viselkedés (például túlzott mosdás, megkergülés) vagy bármilyen bizarr viselkedésmód (például öncsonkítás, hátrafelé járás) megfigyelt eseteit is fel kell jegyezni (32).

38. A vizsgált vegyi anyag első beadását szemtükörrel vagy más, megfelelő eszközzel végzett szemészeti vizsgálat előzi meg, amelyet az összes állaton el kell végezni. E vizsgálatot a vizsgálatsorozat végén meg kell ismételni, lehetőleg az összes állaton, de legalább a magas dózissal kezelt és kontrollcsoportok tagjain. Ha a szemben a kezeléssel összefüggő elváltozást tapasztalunk, az összes állatot meg kell vizsgálni. Ha szerkezeti elemzés vagy egyéb információ szemtoxicitásra utal, a szemvizsgálatot gyakrabban kell elvégezni.

39. Az olyan vegyi anyagok esetében, amelyeknél a korábbi, ismételt adagolású, 28 napos és/vagy 90 napos toxicitási vizsgálatok lehetséges neurotoxikus hatásokat jeleztek, a vizsgálat megkezdését megelőzően, valamint a vizsgálat kezdetét követő 12. hónap végéig 3 hónapos időközönként, továbbá a vizsgálat végén (ha az tovább tart 12 hónapnál) elvégezhető a különböző típusú ingerekre (32) (például hallószervi, vizuális, önérzékelési ingerek) mutatott érzékszervi reakciók vizsgálata (33) (34) (35), a szorítás erejének értékelése (36) és a motoros aktivitás felmérése (37). A követendő eljárásokkal kapcsolatban további részletek a vonatkozó szakirodalomban találhatók. Ettől függetlenül a hivatkozottaktól eltérő alternatív eljárások is alkalmazhatók.

▼M4

40. Az olyan vegyi anyagok esetében, amelyeknél a korábbi, ismételt adagolású, 28 napos és/vagy 90 napos toxicitási vizsgálatok lehetséges immuntoxikus hatásokat jeleztek, e végpont további vizsgálatát lehet végezni a vizsgálat végén.

Testsúly, táplálék-/vízfogyasztás és táplálékhasznosítási képesség

41. A kezelés kezdetekor, az első 13 hét során legalább hetente egyszer, ezután pedig legalább havonta egyszer meg kell mérni az összes állat testsúlyát. A táplálékfogyasztást és a táplálékhasznosítási képességet a vizsgálat első 13 hetében legalább hetente, azt követően pedig legalább havonta egyszer kell mérni. Ha a vizsgált vegyi anyagot ivóvízzel adjuk be, a vízfogyasztást a vizsgálat első 13 hetében legalább hetente, azt követően pedig legalább havonta egyszer kell mérni. A vízfogyasztás mérését olyan vizsgálatok esetében is fontolóra kell venni, amelyek során az ivási szokások megváltoznak.

Hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatok

42. A rágcsálókon végzett vizsgálatok esetében az összes vizsgált állaton (csoportonként 10 hímen és 10 nőstényen) hematológiai vizsgálatokat kell végezni a 3., 6. és 12. hónapban, valamint a vizsgálat végén (ha az hosszabb, mint 12 hónap). Az egereken végzett vizsgálatok esetében kísérő csoportra lehet szükség az összes előírt hematológiai vizsgálat elvégzése céljából (lásd a 19. bekezdést). A nem rágcsálókon végzett vizsgálatok esetében kisebb számú (kutyákon végzett kísérleteknél például nemenként 4) állattól kell mintát venni köztes mintavételi időpontokban, valamint a vizsgálat végén, a rágcsálók esetében leírtak szerint. Ha a korábbi, hasonló dózisszintekkel elvégzett 90 napos vizsgálatok nem mutattak változást a hematológiai paraméterek vonatkozásában, a vizsgálat 3. hónapjában nem szükséges méréseket végezni, rágcsálók és egyéb fajok esetében sem. Vérmintákat meghatározott helyről kell venni, például a szívből vagy a szemgolyó mögötti üregből altatás alatt.

43. Az alábbi paramétereket kell vizsgálni (38): teljes és differenciált leukocitaszám, eritrocitaszám, trombocitaszám, hemoglobinkoncentráció, hematokrit (vérsejtsüllyedés), átlagos sejttérfogat (MCV), eritrociták átlagos hemoglobintartalma (MCH), eritrociták átlagos hemoglobinkoncentrációja (MCHC), prothrombin idő, valamint aktivált parciális tromboplasztin idő. A vizsgált vegyi anyag toxicitásától függően szükség szerint egyéb hematológiai paramétereket, például Heinz-testeket vagy egyéb atipikus eritrocitamorfológiát vagy methemoglobint is lehet mérni. Általánosságban elmondható, hogy rugalmas megközelítés alkalmazandó, amely az adott vizsgált vegyi anyag megfigyelt és/vagy várható hatásaitól egyaránt függ. Ha a vizsgált vegyi anyag a vérképző rendszerre hat, a retikulocitaszám és a csontvelőcitológia is feltüntethető, habár ezek vizsgálatát nem szükséges rutinszerűen elvégezni.

44. A szövetekben jelentkező fontosabb toxikus hatások és különösen a vesékre és a májra gyakorolt hatás vizsgálata érdekében a klinikai biokémiai értékek meghatározását az összes vizsgált állattól (csoportonként 10 hím és 10 nőstény egyedtől) vett vérmintákból kell elvégezni a hematológiai vizsgálatokhoz meghatározott időközönként. Az egereken végzett vizsgálatok esetében kísérő csoportra lehet szükség az összes előírt klinikai biokémiai vizsgálat elvégzése céljából. A nem rágcsálókon végzett vizsgálatok esetében kisebb számú (kutyákon végzett kísérleteknél például nemenként 4) állattól kell mintát venni köztes mintavételi időpontokban, valamint a vizsgálat végén, a rágcsálók esetében leírtak szerint. Ha a korábbi, hasonló dózisszintekkel elvégzett 90 napos vizsgálatok nem mutattak változást a klinikai

▼M4

biokémiai paraméterek vonatkozásában, a vizsgálat 3. hónapjában nem szükséges méréseket végezni, rágcsálók és egyéb fajok esetében sem. A vérvétel előtti éjszaka ajánlatos az állatokat koplaltatni (kivéve egerek esetében) ([1]). A következő paramétereket kell vizsgálni (38): glükóz, karbamid (karbamid-nitrogén), kreatinin, teljes fehérje, albumin, kalcium, nátrium, kálium, teljes koleszterin, legalább két értékelhető minta a májsejtek értékeléséhez (alanin-aminotranszferáz, aszpartát-aminotranszferáz, glutamát-dehidrogenáz, teljes epesav) (39), valamint legalább két értékelhető minta a máj és az eperendszer értékeléséhez (alkáli foszfatáz, gamma-glutamil-transzpeptidáz, 5'-nukleotidáz, teljes bilirubin, teljes epesav) (39). A vizsgált vegyi anyag toxicitásától függően szükség szerint más klinikai kémiai paraméterek, például az éhgyomorra mért trigliceridek, bizonyos hormonok és a kolinészterázszint mérése is elvégezhető. Általánosságban elmondható, hogy rugalmas megközelítés alkalmazandó, amely az adott vizsgált vegyi anyag megfigyelt és/vagy várható hatásaitól egyaránt függ.

45. Vizeletelemzést az összes vizsgált állaton (csoportonként 10 hím és 10 nőstény egyeden), a hematológiai és klinikai kémiai vizsgálatokhoz meghatározott időközönként levett mintákon kell elvégezni. Ha a korábbi, hasonló dózisszintekkel elvégzett 90 napos vizsgálatok nem mutattak változást a vizeletelemzés vonatkozásában, a vizsgálat 3. hónapjában nem szükséges méréseket végezni. A klinikai patológiai vizsgálatra vonatkozó szakértői ajánlás a következő vizsgálandó paramétereket tartalmazza (38): küllem, mennyiség, ozmolalitás vagy fajsúly, pH-érték, összes fehérje, valamint glükóz. Az egyéb mérések közé tartozik a keton, az urobilinogén, a bilirubin és a vizeletben jelen lévő vér vizsgálata. Szükség szerint további paraméterek vizsgálatát is be lehet vezetni a megfigyelt hatás(ok) vizsgálati körének bővítése érdekében.

46. Általánosan elfogadott, hogy kutyákon végzett vizsgálatok esetében a kezelés előtt meg kell határozni a kiinduló hematológiai és klinikai biokémiai változókat, rágcsálók vizsgálatánál azonban ez nem szükséges (38). Ha azonban a rendelkezésre álló kiinduló adatok (lásd az 58. bekezdést) nem bizonyulnak elegendőnek, megfontolandó ezen adatok meghatározása.

PATOLÓGIA

Autopszia

47. Általában a vizsgálatokba bevont összes állatot teljes körű, beható autopsziának kell alávetni, ideértve a következők alapos vizsgálatát: a test külső felszíne, az összes testnyílás, a koponya, a mellüreg, a hasüreg és ezek tartalma. Előírható ugyanakkor (az időközi elpusztítás céljából bevont vagy kísérő csoportoknál), hogy a mérések csak bizonyos főbb paraméterekre, például a neurotoxicitásra vagy immuntoxicitásra korlátozódjanak (lásd a 21. bekezdést). Ezeket az állatokat nem kell alávetni boncolásnak és az azt követő, a következő bekezdésekben ismertetett eljárásoknak. A jelzőállatok esetében a vizsgálatvezető döntésétől függően eseti alapú boncolásra lehet szükség.

([1]) Bizonyos szérum- és a plazmavizsgálatok, főleg a glükóz meghatározása esetén ajánlatos a vizsgálat előtti éjszaka koplaltatni az állatokat. Ennek fő indoka az, hogy a vizsgálatokat megelőző koplaltatás mellőzése szükségszerűen növelné a kapott eredmények variabilitását, ami így megnehezítené a kevésbé jellegzetes hatások felismerését és értelmezését. Meg kell jegyezni azonban, hogy az éjszakai koplaltatás megzavarhatja az állatok általános anyagcseréjét és – különösen azon vizsgálatok esetében, amelyeknél a vizsgált anyagot a táplálékkal adagolják – megzavarhatja a vizsgált vegyi anyagnak való napi expozíciót. Az összes állatot ugyanabban a fiziológiai állapotban kell megvizsgálni, és ezért a részletes vagy neurológiai vizsgálatokat lehetőleg más napra kell ütemezni, mint a klinikai biokémiai vizsgálatokhoz szükséges mintavételt.

▼**M4**

48. A 47. bekezdés utóbbi részében kivételként megjelölt állatokéin kívül az összes állat szerveinek súlyát meg kell mérni. Az összes állat (eltekintve az elhullásközeli állapotban lévő és/vagy a vizsgálat befejeztét megelőzően elpusztított egyedektől) mellékveséit, agyát, mellékheréit, szívét, veséit, máját, petefészkeit, lépét, heréit, pajzsmirigyét (amelyet fixálás után mérünk meg a mellékpajzsmirigyekkel együtt) és méhét megfelelően meg kell tisztítani minden rátapadt szövettől, és azok nedves súlyát a boncolást követően a lehető legrövidebb időn belül meg kell mérni, mielőtt azok kiszáradnának.

49. Az alábbi szöveteket a szövet típusa és a később elvégezni kívánt kórszövettani vizsgálat szempontjából legmegfelelőbb fixálóanyaggal kell tartósítani (40) (a szögletes zárójelben megadott szövetek megőrzése nem kötelező):

minden makroszkopikus elváltozás	szív	hasnyálmirigy	gyomor (előgyomor, mirigygyomor)
mellékvese	csípőbél	mellékpajzsmirigy	[fogazat]
aorta	éhbél	perifériás idegek	here
agy (beleértve a nagyagy, a kisagy és a nyúltvelő/nyúltagyi híd metszeteit)	vese	agyalapi mirigy	csecsemőmirigy
vakbél	könnymirigy (szemüregen kívüli)	prosztata	pajzsmirigy
méhnyak	máj	végbél	[nyelv]
koaguláló mirigy	tüdő	nyálmirigy	légcső
vastagbél	nyirokcsomók (felszíni és mély)	ondóhólyag	húgyhólyag
patkóbél	emlőmirigy (nőstényeknél kötelező, hímeknél csak ha láthatóan kimetszhető)	harántcsíkolt izom	méh (beleértve a méhnyakat)
mellékhere	[felső légutak, beleértve az orrot, az orrkagylókat és az orrmelléküregeket]	bőr	[húgyvezeték]
szem (beleértve a retinát)	nyelőcső	gerincvelő (három szinten: nyaki, mellkasi középső és ágyéki szakasz)	[húgycső]
[combcsont az ízületi felülettel együtt]	[szaglógumó]	lép	hüvely
epehólyag (patkánytól eltérő fajoknál)	petefészek	[szegycsont]	metszet a csontvelőből és/vagy egy friss, csontvelőből felszívott minta
Harder-mirigy			

▼M4

Páros szervek, például vesék, mellékvesék esetében mind a két szervet tartósítani kell. A klinikai és más jellegű megfigyelések alapján további testszövetek vizsgálata is szükséges lehet. A fentieken túl meg kell őrizni minden olyan más szervet is, amely a vizsgált vegyi anyag ismert tulajdonságai alapján valószínűleg célszervnek tekinthető. A dermális úton történő bejuttatást alkalmazó vizsgálatok esetében az orális módon történő beadásnál felsorolt szerveket kell vizsgálni, továbbá a bőrből mintát kell venni a beadás helyéről, és ezt a mintát tartósítani kell. Inhalációs vizsgálatok esetében a légzőrendszerből származó tartósított és vizsgált szövetek felsorolásának követnie kell az e melléklet B.8. (9) és B.29. fejezetében (10) tett ajánlásokat. Egyéb szervek/szövetek esetében (valamint a légzőrendszerből származó tartósított szöveteken túl) az orális úton történő beadásnál felsorolt szerveket kell vizsgálni.

Kórszövettani vizsgálatok

50. A toxikológiai patológiai vizsgálatok elvégzésének legjobb gyakorlatára vonatkozóan iránymutatás áll rendelkezésre (40). Legalább a következő szöveteket kell kórszövettani vizsgálatnak alávetni:

— a magas dózissal kezelt csoportból és a kontrollcsoportokból származó összes szövet,

— a vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított állatokból származó összes szövet,

— a makroszkopikus rendellenességeket mutató összes szövet,

— a célszöveteket, vagy azon szöveteket, amelyek a legnagyobb dózissal kezelt csoportnál a kezelésnek tulajdonítható elváltozásokat mutatnak, az összes többi dóziscsoport összes állatánál meg kell vizsgálni,

— páros szervek, például vesék, mellékvesék esetében mind a két szervet vizsgálni kell.

MEGFIGYELÉSEK (KARCINOGENITÁSI FÁZIS)

51. Rendszerint a nap elején és végén – beleértve a hétvégéket és az ünnepnapokat is – az összes állatot meg kell vizsgálni, hogy nem mutatja-e megbetegedés jeleit vagy nem hullott-e el. Ezen túlmenően az állatokat naponta egyszer meg kell vizsgálni, hogy mutatnak-e meghatározott, toxikológiai szempontból lényeges tüneteket. A gyomorszondát alkalmazó vizsgálatok esetében az állatokat közvetlenül az adagolás után meg kell vizsgálni. Külön figyelmet kell fordítani a daganatképződésre; minden, szemmel látható vagy kitapintható daganat megjelenésének idejét, helyét, méreteit, megjelenési formáját és növekedését fel kell jegyezni.

52. A kezelés kezdetekor, az első 13 hét során legalább hetente egyszer, ezután pedig legalább havonta egyszer meg kell mérni az összes állat testsúlyát. A táplálékfogyasztást és a táplálékhasznosítási képességet a vizsgálat első 13 hetében legalább hetente, azt követően pedig legalább havonta egyszer kell mérni. Ha a vizsgált vegyi anyagot ivóvízzel adjuk be, a vízfogyasztást a vizsgálat első 13 hetében legalább hetente, azt követően pedig legalább havonta egyszer kell mérni. A vízfogyasztás mérését olyan vizsgálatok esetében is fontolóra kell venni, amelyek során az ivási szokások megváltoznak.

▼M4

Hematológiai, klinikai biokémiai és egyéb mérések

53. A vizsgálatból nyerhető lehető legtöbb információ megszerzése érdekében – különösen a hatásmechanizmussal kapcsolatos szempontok meghatározása céljából – vérminták vehetők a hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatokhoz, habár ez a vizsgálatvezető döntésén múlik. Vizeletelemzés elvégzése is célszerű lehet. Ezekről a paraméterekről a vizsgálat rendszerint 12 hónapig tartó (lásd a 34. bekezdést) krónikus toxicitási fázisában használt állatokra vonatkozó adatok szolgáltatnak információt. Az ilyen minták karcinogenitási vizsgálat részeként történő levételének értékére vonatkozó további útmutatás a 116. iránymutatásban található (7). Vérminták levétele esetén ezeket a mintákat a vizsgálati időszak végén kell levenni, közvetlenül az állatok elpusztítása előtt vagy ennek részeként. Vérmintákat meghatározott helyről kell venni, például a szívből vagy a szemgolyó mögötti üregből altatás alatt. Vérkenet is készíthető vizsgálat céljára, különösen akkor, ha a csontvelő tűnik a célszervnek, bár a vérkenetek karcinogenitási fázisban történő ilyen jellegű vizsgálatának a karcinogén/onkogén hatás meghatározása szempontjából képviselt értéke megkérdőjelezhető (38).

PATOLÓGIA

Autopszia

54. A jelzőállatok és a kísérő csoportba tartozó többi állat kivételével (lásd a 20. bekezdést) a vizsgálatokba bevont összes állatot teljes körű, beható autopsziának kell alávetni, ideértve a következők alapos vizsgálatát: a test külső felszíne, az összes testnyílás, a koponya, a mellüreg, a hasüreg és ezek tartalma. A jelzőállatok és a kísérő csoportba tartozó többi állat esetében a vizsgálatvezető döntésétől függően eseti alapú boncolásra lehet szükség. A szervek súlyának mérése általában nem képezi a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok részét, mivel a geriátriai változások és – a későbbi szakaszokban – a tumorok kifejlődése zavaró tényezők lehetnek a szervek súlyával kapcsolatos adatok hasznosságát illetően. Ezek a mérések azonban kritikusak lehetnek az adatok bizonyító erejének mérlegelése során és különösen a hatásmechanizmussal kapcsolatos megfontolások tekintetében. Ha a szervek súlyának mérése kísérő vizsgálat részét képezi, a mérést legkésőbb a vizsgálat megkezdése után egy évvel el kell végezni.

55. Az alábbi szöveteket a szövet típusa és a később elvégezni kívánt kórszövettani vizsgálat szempontjából legmegfelelőbb fixálóanyaggal kell tartósítani (40) (a szögletes zárójelben megadott szövetek megőrzése nem kötelező):

minden makroszkopikus elváltozás	szív	hasnyálmirigy	gyomor (előgyomor, mirigygyomor)
mellékvese	csípőbél	mellékpajzsmirigy	[fogazat]
aorta	éhbél	perifériás idegek	here
agy (beleértve a nagyagy, a kisagy és a nyúltvelő/nyúltagyi híd metszeteit)	vese	agyalapi mirigy	csecsemőmirigy
vakbél	könnymirigy (szemüregen kívüli)	prosztata	pajzsmirigy
méhnyak	máj	végbél	[nyelv]
koaguláló mirigy	tüdő	nyálmirigy	légcső
vastagbél	nyirokcsomók (felszíni és mély)	ondóhólyag	húgyhólyag

▼M4

patkóbél	emlőmirigy (nőstényeknél kötelező, hímeknél csak ha láthatóan kimetszhető)	harántcsíkolt izom	méh (beleértve a méhnyakat)
mellékhere	[felső légutak, beleértve az orrot, az orrkagylókat és az orrmelléküregeket]	bőr	[húgyvezeték]
szem (beleértve a retinát)	nyelőcső	gerincvelő (három szinten: nyaki, mellkasi középső és ágyéki szakasz)	[húgycső]
[combcsont az ízületi felülettel együtt]	[szaglógumó]	lép	hüvely
epehólyag (patkánytól eltérő fajoknál)	petefészek	[szegycsont]	metszet a csontvelőből és/vagy egy friss, csontvelőből felszívott minta
Harder-mirigy			

Páros szervek, például vesék, mellékvesék esetében mind a két szervet tartósítani kell. A klinikai és más jellegű megfigyelések alapján további testszövetek vizsgálata is szükséges lehet. A fentieken túl meg kell őrizni minden olyan más szervet is, amely a vizsgált vegyi anyag ismert tulajdonságai alapján valószínűleg célszervnek tekinthető. A dermális úton történő bejuttatást alkalmazó vizsgálatok esetében az orális módon történő beadásnál felsorolt szerveket kell vizsgálni, továbbá a bőrből mintát kell venni a beadás helyéről, és ezt a mintát tartósítani kell. Inhalációs vizsgálatok esetében a légzőrendszerből származó tartósított és vizsgált szövetek felsorolásának követnie kell az e melléklet B.8. (8) és B.29. fejezetében (9) tett ajánlásokat. Egyéb szervek/szövetek esetében (valamint a légzőrendszerből származó tartósított szöveteken túl) az orális úton történő beadásnál felsorolt szerveket kell vizsgálni.

Kórszövettani vizsgálatok

56. A toxikológiai patológiai vizsgálatok elvégzésének legjobb gyakorlatára vonatkozóan iránymutatás áll rendelkezésre (40). Legalább az alábbi szöveteket kell vizsgálni:

— a magas dózissal kezelt csoportból és a kontrollcsoportokból származó összes szövet,

— a vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított állatokból származó összes szövet,

— a makroszkopikus rendellenességeket, többek között tumorokat mutató összes szövet,

— azon szöveteket, amelyek a legnagyobb dózissal kezelt csoportnál a kezelésnek tulajdonítható kórszövettani elváltozásokat mutatnak, az összes többi dóziscsoport összes állatánál meg kell vizsgálni,

— páros szervek, például vesék, mellékvesék esetében mind a két szervet vizsgálni kell.

▼M4

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS (KARCINOGENITÁS ÉS KRÓNIKUS TOXICITÁS)

Adatok

57. Az összes értékelt paraméterre vonatkozó adatokat minden egyes állat esetében rögzíteni kell. Ezenfelül az összes adatot táblázat formájában összegezni kell, a vizsgált állatok minden csoportja tekintetében bemutatva, hogy hány egyeddel indult a vizsgálat, hány állat pusztult el, illetve hányat kellett elpusztítani humánus okokból a vizsgálat során, valamint az elpusztulás vagy humánus okokból való elpusztítás időpontját, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ideértve bármely toxikus hatás kezdetének idejét, időtartamát és súlyosságát, az elváltozásokat mutató állatok számát, az elváltozások típusát és az egyes elváltozástípusokat mutató állatok százalékos arányát. Az összegző adattáblázatoknak tartalmazniuk kell a toxikus hatásokat vagy elváltozásokat mutató állatokra vonatkozó átlagértékeket és szórásokat (folyamatos vizsgálati adatok esetében), valamint az elváltozások osztályozását.

58. A vizsgálat eredményeinek értékelése szempontjából hasznosak lehetnek a korábbi kontrolladatok, például abban az esetben, ha a párhuzamos kontrollokból származó adatok vélhetően lényegesen eltolódottak az ugyanabban a vizsgálati létesítményben/kolóniában lévő kontrollállatoktól származó újabb adatokhoz képest. Korábbi kontrolladatok elemzése esetén ugyanazon laboratórium által benyújtott, ugyanolyan korú és ugyanabba a törzsbe tartozó állatokra vonatkozó, az adott vizsgálatot megelőző öt évből kell származó adatokat kell felhasználni.

59. A számszerű eredményeket adott esetben megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazásával kell kiértékelni. A statisztikai módszereket és az elemezendő adatokat a vizsgálat tervezése során kell kiválasztani (9. bekezdés). A kiválasztás során szükség szerint elő kell írni a túlélésre vonatkozó kiigazításokat.

60. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— fizikai jelleg, tisztaság, valamint fizikai és kémiai tulajdonságok,

— azonosító adatok,

— a vegyi anyag származási helye,

— gyártási szám,

— kémiai elemzésről szóló tanúsítvány.

Vivőanyag (ha van):

— a vivőanyag kiválasztásának indokolása (ha az nem víz).

Kísérleti állatok:

— a felhasznált faj/törzs, és a választás indokolása,

— az állatok száma, életkora és neme a vizsgálat kezdetekor,

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.,

— az egyes állatok testsúlya a vizsgálat kezdetekor.

▼M4

Vizsgálati körülmények:

— a beadási mód és a dózis kiválasztásának indokolása,

— az adatok elemzéséhez adott esetben használt statisztikai módszerek,

— a vizsgált vegyi anyag formulázására/a takarmány előkészítésére vonatkozó részletes adatok,

— a készítmény elért koncentrációjára, stabilitására és homogenitására vonatkozó analitikai adatok,

— a beadási mód és a vizsgált vegyi anyag bejuttatására vonatkozó részletes adatok,

— inhalációs vizsgálatok esetében információ arra vonatkozóan, hogy a bejuttatás csak orron vagy a teljes testfelületen keresztül történt-e,

— tényleges dózisok (mg/testsúlykilogramm/nap), valamint a vizsgált vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (mg/kg vagy ppm) a tényleges dózisra való átszámításhoz használt átszámítási tényező, ha ez alkalmazható,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok.

Eredmények (az adatok táblázatos összefoglalását és az egyes állatokra vonatkozó adatokat is meg kell adni):

Általános

— túlélési adatok,

— testsúly/testsúlyban bekövetkezett változások,

— takarmányfogyasztás, a táplálékhasznosítási képességgel kapcsolatos számítások, ha vannak, valamint adott esetben vízfogyasztás,

— toxikokinetikai adatok, ha rendelkezésre állnak,

— oftalmoszkópia (ha rendelkezésre áll),

— hematológia (ha rendelkezésre áll),

— klinikai kémia (ha rendelkezésre áll).

Klinikai leletek

— toxicitási tünetek,

— az esetleges rendellenességek előfordulása (és – ha pontozzuk – azok súlyossága),

— a megfigyelt klinikai tünetek jellege, súlyossága és időtartama (átmeneti vagy állandó).

Boncolási adatok

— testsúly elpusztuláskor,

— szervek súlya és ezek aránya, ha alkalmazható,

— boncolási eredmények; rendellenességek előfordulása és súlyossága.

Kórszövettani vizsgálatok

— nem neoplasztikus kórszövettani leletek,

— neoplasztikus kórszövettani leletek,

▼M4

— a makroszkopikus és mikroszkopikus vizsgálatok leletei közötti összefüggés,

— a kezeléssel összefüggő összes kórszövettani lelet részletes leírása, beleértve a súlyossági fokokat,

— a tárgylemezek szakértői felülvizsgálatáról szóló jelentés.

Az eredmények statisztikai feldolgozása, ha alkalmazható

Az eredmények tárgyalása, beleértve a következőket:

— az esetlegesen alkalmazott modellezési megközelítések tárgyalása,

— dózis-válasz összefüggések,

— korábbi kontrolladatok,

— a hatásmechanizmusra vonatkozó bármely információ figyelembevétele,

— BMD, NOAEL vagy LOAEL meghatározása,

— humán relevancia.

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208

(4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191

(5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445

(6) E melléklet B.27., Szubkrónikus orális toxicitási vizsgálat, 90 napos, ismételt adagolású orális toxicitási vizsgálat nem rágcsálókon című fejezete.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) E melléklet B.8., Szubakut inhalációs toxicitás: 28 napos vizsgálat című fejezete.

(10) E melléklet B.29., Szubkrónikus inhalációs toxicitás: 90 napos vizsgálat című fejezete.

(11) E melléklet B.9., Ismételt adagolású (28 napos) toxicitás (dermális) című fejezete.

▼**M4**

(12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36: 793-801.

(13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33: 581-589.

(14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89: 51-56.

(15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33: 591-653.

(16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

(17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9-35.

(18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al*. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37-68.

(19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to LIFE Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69-98.

(20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International LIFE Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1): 214.

(25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

(26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105: 1196-1203.

▼**M4**

(27) Az Európai Parlament és a Tanács 2010. szeptember 22-i 2010/63/EU irányelve a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről HL L 276., 2010.10.20., 33. o.

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21: 15-23.

(32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appéldául Pharmacol. 108: 267-283.

(36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(38) Weingand K, Brown G, Hall R *et al*. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appéldául Toxicol. 29: 198-201.

(39) EMEA (draft) document ‘Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity’ (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁS

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼B

B.34. **EGYGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS TOXICITÁSVIZSGÁLAT**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot naponta szájon át, fokozatosan növekvő adagokban adjuk be több kísérleti állatcsoportnak, hímeknek és nőstényeknek. A hímeknek a növekedés ideje alatt és legalább egy teljes csírasejtképzési cikluson keresztül (egérben megközelítőleg 56 nap, patkányban 70 nap) kell adni a vizsgált anyagot, hogy annak a csírasejtképzésre gyakorolt esetleges kedvezőtlen hatása kifejlődhessen.

A szülői (P) nemzedék nőstényeinek legalább két teljes párzási időszakon keresztül kell adagolni a vizsgált anyagot, hogy annak az ivarzási ciklusra gyakorolt esetleges kedvezőtlen hatása kifejlődhessen. Ezután a kísérleti állatokat pároztatják. A vizsgált anyagot a párzási időszak alatt mindkét nemnek adagolni kell, azt követően csak a nőstényeknek a vemhesség ideje alatt, valamint a szoptatás időszakában. Az anyag inhalációs adagolásához a módszer módosítást igényel.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. *Előkészületek*

Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell beosztani. Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napon keresztül a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. A vizsgált anyag ajánlott adagolási módja: a takarmánnyal vagy az ivóvízzel. Más alkalmazási módok is elfogadhatók. A vizsgált anyagokat valamennyi állatnak azonos módszerrel kell adagolni a vizsgálat teljes időtartama alatt. Ha az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot vagy más adalékanyagot használnak, meg kell bizonyosodni arról, hogy azok nem rendelkeznek toxikus hatással.

Az adagolást heti hét napon kell végezni.

▼B

1.6.2. *A kísérlethez felhasznált állatok*

A faj kiválasztása

A javasolt faj a patkány vagy az egér. Korábban vizsgálatban még részt nem vett, egészséges állatokat kell használni. Ne használjunk rossz termékenységű törzseket. Az állatokat faj, törzs, nem, súly és/vagy kor szerint kell jellemezni.

A termékenység megállapítása érdekében mind a hím, mind a nőstény állatokat meg kell vizsgálni. Mind a kontroll-, mind a kísérleti csoportban csak az elválasztást követően lehet megkezdeni a vizsgált anyag adagolását.

Az állatok száma és neme

Minden adagolási és kontrollcsoportnak elegendő állatot kell tartalmaznia ahhoz, hogy legalább 20 vemhes, illetve az elléshez közel álló nőstény legyen benne.

A cél az, hogy megfelelő mennyiségű vemhességet és utódot hozzanak létre ahhoz, hogy felmérhessük az anyag hatását a termékenységre, a vemhességre és az anyai viselkedésre a szülői (P) nemzedékben, valamint a szopásra, a növekedésre és a fejlődésre az F1 utódnemzedékben a fogamzástól a szoptatástól való elválasztásig.

1.6.3. *Vizsgálati körülmények*

Annyi élelmet és vizet kell adni, amennyire csak szükség van (ad libitum). Az ellés előtt a vemhes nőstényeket el kell különíteni, elletőketrecekbe kell rakni, és az alom kialakításához használt (fészeképítő) anyaggal is el lehet látni.

1.6.3.1. Adagolási szintek (dózisok)

Legalább három adagolási szintet (dózist) és egy kontrollt kell használni. Ha az anyag beadásához vivőanyagot alkalmaznak, akkor a kontrollcsoportnak a vivőanyagból a felhasznált legnagyobb mennyiséget kell kapnia. Ha a vizsgált anyag csökkent táplálékfelvételt, illetve táplálékhasznosítást vált ki, szükség lehet egy korlátozott etetéssel tartott kontrollcsoport beállítására. Ideális esetben, ha azt a vizsgált anyag biológiai, illetve fizikokémiai tulajdonságai lehetővé teszik, a legnagyobb adaggal kezelt csoport szülő állataiban (P) ugyan jelentkeznie kell a toxikus hatásnak, de elhullásnak nem. A közepes adaggal kezelt csoport(ok)ban a vizsgált anyagnak tulajdonítható toxikus hatás minimális jeleinek kell megjelenni, és az alacsony adaggal kezelt csoportban az anyag nem okozhat észrevehető kedvezőtlen hatást sem a szülőknél, sem az utódoknál. Ha az állatok gyomorszondával vagy kapszulában kapják az adagot, azt az adott állat testsúlyára számítva kell adni, és azt hetente a testsúly változásaihoz kell igazítani. A vemhesség alatt a nőstények adagja szükség esetén a vemhesség nulladik, illetve hatodik napján mért testsúlyra számítható ki.

1.6.3.2. Határérték-vizsgálat

Alacsony toxicitású anyagoknál, ha az 1 000 mg/testsúlykilogramm, illetve az azt meghaladó dózis nem okoz semmilyen zavart a szaporodási képességben, a többi adagolási szinten végzett vizsgálatok szükségtelennek tekinthetők. Ha a nagy dózissal kezelt csoportban az anyára gyakorolt toxikus hatást egyértelműen mutató előzetes vizsgálatban nem volt észlelhető kedvezőtlen hatás a termékenység vonatkozásában, akkor a többi adagolási szinten végzett vizsgálat szükségtelennek tekinthető.

▼B

1.6.3.3. A kísérlet végrehajtása

Vizsgálati ütemterv

A szülői (P) nemzedék hímjeinél a napi adagolást az állatok öt- és kilenchetes kora között kell megkezdeni, miután a szoptatott állatokat elválasztották, és legalább öt napon keresztül a vizsgálati körülmények mellett tartották. A patkányoknál az adagolást a párzási időszak előtt 10 héten át kell folytatni (egér esetében ez az idő nyolc hét). A hímeket vagy a párzási időszakot követően kell elpusztítani és megvizsgálni, vagy a vizsgálati étrend mellett kell azokat tovább tartani egy esetleges második alom létrehozásához, majd nem sokkal a vizsgálat vége előtt kell elpusztítani és megvizsgálni. A szülői nemzedék (P) nőstényeinél az ötnapos szoktatást követően kell megkezdeni a vizsgált anyag adagolását, és legalább a párzást két héttel megelőző időpontig kell folytatni. A P nőstényeknél a napi adagolást folytatni kell az egész, háromhetes párzási időszak során és a vemhesség alatt, amíg az F1 utódnemzedéket el nem választjuk. Az adagolás ütemezése szükséges lehet akkor, ha más információ is rendelkezésre áll a vizsgált anyagról, például annak anyagcsere-fokozó hatásairól vagy biológiai felhalmozódásáról.

Pároztatás

A reprodukciós toxicitásvizsgálatokban vagy 1:1 (egy hím-egy nőstény) vagy 1:2 (egy hímkét nőstény) párosítást alkalmazhatunk.

Az 1:1 arányú pároztatás esetén egy nőstényt addig kell ugyanazon hímmel együtt tartani, míg teherbe nem esett, vagy három hét időtartamig. A nőstényt minden reggel megvizsgáljuk a sperma vagy a hüvelydugó jelenléte szempontjából. A vemhesség nulladik napjának azt a napot tekintjük, amikor a hüvelydugó vagy a sperma megtalálható.

A sikertelen párokat megvizsgálják annak megállapítása érdekében, hogy mi az oka a terméketlenségnek.

Ez adott esetben azt jelentheti, hogy tovább kell pároztatni az állatot olyan hímekkel vagy anyaállatokkal, amelyek termékenységéről már meggyőződtek, illetve a szaporítószerveket mikroszkóppal megvizsgálják, illetve az ivarzási ciklust vagy az ondóképződést ellenőrzik.

Alomszám

A termékenységi vizsgálat alatt kezelt állatokat a szokványos módon hagyják megelleni, és bárminemű külső beavatkozás nélkül hagyják, hogy utódaikat az elválasztásig neveljék.

Ha standardizálunk, az alábbi eljárás javasolt. Az ellés utáni első és negyedik nap között módosíthatjuk az egyes almok egyedszámát a létszám fölötti kölykök eltávolításával, hogy az eredmény – amennyire lehetséges – almonként négy hím és négy nőstény utód legyen.

Ha a hím és nőstény utódok száma nem teszi lehetővé a nemenként négy azonos nemű utódot tartalmazó almok kialakítását, részleges kiegyenlítés is elfogadható (például öt hím és három nőstény). A nyolcnál kevesebb egyedet számláló almokban a kiegyenlítés nem lehetséges.

▼B

1.6.4. *Megfigyelések*

A vizsgálati időszak folyamán minden állatot naponta legalább egyszer meg kell figyelni. Feljegyzést kell készíteni a lényeges magatartászavarokról, az elhúzódó vagy nehéz ellés jeleiről, valamint a toxikus hatásra utaló minden egyéb tünetről, beleértve az elhullást is. A pároztatás előtt és a pároztatási időszak alatt a takarmányfogyasztást naponta kell mérni. Az ellés után és a szoptatás alatt a takarmányfogyasztás mérését (és az ivóvízfogyasztás mérését, ha a vizsgált anyagot az ivóvízben adtuk be) ugyanazon a napon kell elvégezni, mint az utódok testsúlymérését. A P generáció hímjeinek és nőstényeinek testsúlyát az adagolás megkezdésének napján kell megmérni, és ezt követően hetente meg kell ismételni a mérést. E megfigyeléseket minden felnőtt állatnál egyedenként kell rögzíteni.

A terhességi (gesztációs) időszakot a vemhesség nulladik napjától kell számolni. Minden utódot az ellést követően a lehető leghamarabb meg kell vizsgálni, és meg kell állapítani a kicsinyek számát és nemét, a halvaszületések arányát, valamint a durva rendellenességek jelenlétét.

A halva született és a negyedik napig elpusztított utódokat meg kell őrizni, és meg kell vizsgálni az esetleges születési rendellenességek szempontjából. Az élő utódokat az ellést követő reggelen meg kell számolni és testsúlymérést is kell végezni, majd ezt meg kell ismételni előbb a negyedik és hetedik napon, majd a vizsgálat végéig hetente, egyedileg mérve az állatokat.

Az anyaállatokon vagy az utódokon észlelt fizikai és magatartásbeli rendellenességeket fel kell jegyezni.

1.6.5. *Kórtan*

1.6.5.1. Autopszia

A P generációhoz tartozó állatokat, ha azokat elpusztítják, illetve azok elpusztulnak a vizsgálat során, makroszkópos vizsgálatnak kell alávetni rendellenességeket vagy patológiás elváltozásokat keresve, különös tekintettel a szaporodási rendszer szerveire. Az elhullott, illetve haldokló kicsinyeket a rendellenességek szempontjából kell megvizsgálni.

1.6.5.2. Kórszövettan

A P generációhoz tartozó állatok petefészkeit, méhét, méhnyakát, hüvelyét, heréit, mellékheréjét, ondóhólyagját, prosztatáját, alvadékképző mirigyét, agyalapi mirigyét és cél szervét/cél szerveit el kell tenni mikroszkópos vizsgálatok céljaira. Abban az esetben, ha más, többféle dózissal végzett vizsgálatokban e szerveknek a vizsgálata nem történt meg, akkor valamennyi nagy adaggal kezelt és kontrollállat szóban forgó szerve esetében el kell végezni a mikroszkópos vizsgálatot, és – ha a gyakorlatban megoldható – ugyanez vonatkozik a menet közben elpusztult állatokra is.

Azon szerveket, amelyek az említett állatokban rendellenességeket mutatnak, a továbbiakban az összes többi P állatban is meg kell vizsgálni. Ezen esetekben az összes olyan szövetet mikroszkópos szövettani vizsgálatnak kell alávetni, amelyeken feltűnő kóros elváltozások mutatkoztak. Amint az a pároztatási eljárások ismertetése során javasolt volt, a feltehetően terméketlen állatok szervei esetében is elvégezhető a mikroszkópos vizsgálat.

▼B

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely minden vizsgálati csoportban megadja az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a termékeny hím állatok számát, a vemhes nőstények számát, az elváltozások típusait és az egyes elváltozási fajtákat mutató állatok százalékos arányát.

Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármely elfogadott statisztikai módszer használható.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— felhasznált faj, törzs,

— a toxikus reakciók adatai nemenként és dózisonként, beleértve a termékenységet, a gesztációs időt és az életképességet is,

— az elhullás ideje a vizsgálat során, illetve, hogy az állatok megélték-e az elpusztítás tervezett időpontját, illetve a vizsgálat végét,

— egy táblázat az utódok súlyáról, a kicsinyek átlagos súlyáról, valamint a vizsgálat végén az egyes utódok súlyáról,

— a szaporodásra, az utódokra, illetve a születés utáni fejlődésre gyakorolt toxikus és egyéb hatások leírása,

— az egyes mérgezési tünetek megfigyelésének időpontja és a megfigyelést követő változásuk,

— testsúlyadatok a P generációnál,

— boncolási leletek,

— valamennyi mikroszkópos lelet részletes leírása,

— az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,

— az eredmények megvitatása,

— az eredmények értelmezése.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

▼B

B.35. KÉTGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS TOXICITÁSVIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

Ez a módszer az OECD TG 416 (2001) módszer megfelelője.

1.1. BEVEZETÉS

E kétgenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálati módszer segítségével általános információk nyerhetők egy vizsgálandó anyagnak a hím és női szaporítórendszer épségére és teljesítőképességére, ezen belül az ivarmirigyek működésére, az ivari ciklusra, a párzási viselkedésre, a fogantatásra, a vemhességre, az ellésre, a szoptatásra és az elválasztásra, valamint az utódok növekedésére és fejlődésére gyakorolt hatásaival kapcsolatosan. A vizsgálat emellett információkat nyújthat a vizsgálandó anyagnak az újszülött kori morbiditásra, mortalitásra gyakorolt hatásaival kapcsolatosan, előzetes adatokat szolgáltathat a prenatális és posztnatális fejlődési toxicitásról, illetve útmutatóként szolgálhat a későbbi vizsgálatokhoz is. Az F1 generáció növekedésének és fejlődésének tanulmányozásán kívül e vizsgálati módszer segítségével a hím és női szaporítórendszer épsége és teljesítőképessége, valamint az F2 generáció növekedése és fejlődése is tanulmányozható. A fejlődési toxicitással és a funkcionális defektusokkal kapcsolatban további információk úgy szerezhetők, ha ezt az eljárást adott esetben a fejlődési toxicitási és/vagy fejlődési neurotoxicitási módszereket segítségül híva további vizsgálati protokollokkal egészítik ki, de az említett végpontok a megfelelő vizsgálati módszerek alkalmazásával külön vizsgálatokban is tanulmányozhatók.

1.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgálandó anyagot fokozatosan növekvő dózisokban kell adagolni hím és nőstény állatok több csoportjának. A P generációba tartozó hímeknek egyrészt a növekedés során, másrészt legalább egy teljes spermaképződési ciklus során (egérben körülbelül 56 nap, patkányban pedig körülbelül 70 nap) kell adagolni az anyagot ahhoz, hogy bármilyen, a spermaképződésre gyakorolt káros hatást ki lehessen váltani. A spermára gyakorolt hatásokat egy sor spermaparaméter (pl. spermamorfológia és -motilitás), valamint szövetpreparátumok és részletes kórszövettani vizsgálatok segítségével kell meghatározni. Ha rendelkezésre állnak megfelelő időtartamú, pl. legalább 90 napos ismételt dózisú vizsgálatokból származó, a spermaképződéssel kapcsolatos adatok, a P generációba tartozó hímeket nem kell bevonni az értékelésbe. A spermamintákat vagy az azokról készült digitális felvételeket azonban ajánlatos az esetleges későbbi értékelések céljára megőrizni, illetve elmenteni. A P generációba tartozó nőstényeknek egyrészt a növekedés során, másrészt több teljes ivari ciklus során kell adagolni a vizsgálandó anyagot ahhoz, hogy észlelhetők legyenek az ivari ciklus szabályosságára kifejtett esetleges káros hatások. A vizsgálandó anyagot a párzás és az ennek eredményeként létrejövő vemhesség során, sőt egészen az F1 utódok elválasztásának ideje alatt is kell adagolni a szülőknek (azaz a P generációba tartozó állatoknak). Az elválasztáskor a kezelést az F1 utódokon kell folytatni, egészen felnőtté válásukig, párzásukig, illetve az F2 generáció létrejöttéig, amíg meg nem történik az F2 generáció elválasztása.

Minden állaton klinikai megfigyeléseket és kórbonctani vizsgálatokat kell végezni a toxicitás jeleinek kimutatása érdekében, és külön hangsúlyt kell fektetni a hím és női szaporítórendszer épségére és teljesítőképességére, valamint az utódok növekedésére és fejlődésére.

▼B

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ISMERTETÉSE

1.3.1. **Az állatfaj kiválasztása**

A vizsgálatok céljára a preferált állatfaj a patkány. Ettől eltérő fajok alkalmazását megfelelően indokolni kell, és a megfelelő módosításokra is szükség lesz. Nem szabad olyan törzseket alkalmazni, amelyek kevéssé termékenyek, vagy amelyekben magas a fejlődési defektusok előfordulási gyakorisága. A vizsgálat megkezdésekor az egyes kísérleti állatok testtömegének csak minimális mértékben szabad különböznie egymástól, és egyik ivar esetében sem térhet el 20 %-nál magasabb mértékben az ivar átlagától.

1.3.2. **Az állatok tartásának és etetésének körülményei**

A kísérleti helyiség hőmérsékletének 22 °C (± 3 °C)-nak kell lennie. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50 és 60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását az is befolyásolhatja, hogy ha a vizsgálandó anyagot táplálékkal adják be, akkor azok megfelelő módon keveredjenek el egymással.

Az állatok egyedileg vagy azonos ivarú egyedekből álló kisebb csoportokban is tarthatók. A pároztatásokat erre a célra alkalmas ketrecekben kell végezni. Ha meggyőződtek a párzás megtörténtéről, a pároztatott nőstényeket egyedileg kell elhelyezni ellető vagy fiaztató ketrecekben. A pároztatott patkányokat kis csoportokban is lehet tartani, de az ellés előtt egy vagy két nappal külön kell választani őket. Az ellés közeledtével a pároztatott állatok számára megfelelő és meghatározott fészekrakó anyagot kell biztosítani.

1.3.3. **Az állatok előkészítése**

Legalább 5 napon át a laboratórium körülményeihez szoktatott, egészséges állatokat kell alkalmazni, amelyek korábban nem voltak más kísérletnek alanyai. A kísérleti állatok jellemzésekor meg kell adni az állat faját, törzsét, származását, ivarát, testtömegét és/vagy életkorát. Ismerni kell, hogy mely állatok között áll fenn testvéri viszony, hogy elkerülhető legyen ezek pároztatása. Az állatokat véletlenszerűen kell beosztani a kontroll- és a kezelési csoportokba. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezése jelentette lehetséges hatásokat. Minden állatot egyedi azonosító számmal kell ellátni. A P generáció esetében ezt még a kezelés megkezdése előtt meg kell tenni. Az F1 generáció esetében a későbbi pároztatásra kiválasztott állatokat az elválasztáskor egyedi azonosítóval kell ellátni. Minden kiválasztott F1 állat esetében meg kell őrizni azokat az adatokat, amelyek rögzítik, hogy az állat melyik alomból származik. Ha az utódok testtömegének mérését vagy bármely más funkcionális vizsgálat elvégzését is fontolóra veszik, akkor ajánlatos a születés után a lehető leghamarabb azonosítóval ellátni a kölyköket.

A kezelés megkezdésekor a szülőknek (P generáció) körülbelül 5–9 hetesnek kell lenniük. Amennyire csak megoldható, az állatoknak az összes vizsgálati csoportban nagyjából azonos testtömegűnek és korúnak kell lenniük.

▼B

1.4. ELJÁRÁS

1.4.1. **Az állatok száma és ivara**

Minden kezelési és kontrollcsoportban elegendő számú állatnak kell lennie ahhoz, hogy az elléskor vagy akörül lehetőleg legalább 20 vemhes nőstény tartozzon egy-egy csoportba. A kezeléssel összefüggésben nemkívánatos hatásokat (pl. sterilitást vagy magas dózisban túlzott toxicitást) kiváltó anyagok esetében előfordulhat, hogy ezt nem lehet megoldani. A cél az, hogy elegendő számú vemhesség jöjjön létre az anyagnak a termékenységre, a vemhességre, az anyai viselkedésre és szoptatásra, az F1 utódoknak a fogantatástól az ivarérettségig történő növekedésére és fejlődésére, valamint az F2 utódoknak az elválasztásig tartó időszakban történő fejlődésére gyakorolt esetleges hatások értékeléséhez. Nem feltétlenül teszi érvénytelenné tehát a vizsgálatot az, ha nem lehet megoldani, hogy a kívánt számú (azaz 20) vemhes állat álljon rendelkezésre, és ennek jelentőségét minden egyes esetben különkülön kell értékelni.

1.4.2. **A dózisok előkészítése**

A vizsgálandó anyagot ajánlatos orálisan adagolni (a táplálékkal, az ivóvízzel vagy mesterséges táplálással), kivéve, ha más beadási módot (pl. dermális vagy inhalálásos alkalmazást) tartanak megfelelőbbnek.

Ahol szükséges, a vizsgálandó anyagot megfelelő vivőanyagban kell feloldani vagy szuszpendálni. Ahol lehet, elsősorban vizes oldatot/szuszpenziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (pl. kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikus jellemzőit. Meg kell határozni továbbá azt is, hogy a vizsgálandó anyag mennyire stabil az adott vivőanyagban.

1.4.3. **Adagolás**

Legalább három dózist és ezzel párhuzamos kontrollt kell alkalmazni. Hacsak a vizsgálandó anyag fizikai-kémiai jellege vagy biológiai hatásai nem szabnak ennek határt, a legmagasabb dózist úgy kell megválasztani, hogy toxicitást idézzen elő, de ne okozzon elhullást vagy súlyos szenvedést. Váratlan elhullások esetén, ha a szülői (P) generáció elhullási aránya alacsonyabb, mint körülbelül 10 százalék, a vizsgálat még általában elfogadható. A dózisok csökkenő sorrendjét úgy kell megválasztani, hogy kimutathatók legyenek az esetleges dózisfüggő hatások és a nem észlelhető káros hatás szintje (NOAEL). A csökkenő dózisszintek meghatározásához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása, és nagyon nagy intervallumok (pl. 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazása esetén gyakran előnyös a dózisok közé egy negyedik vizsgálati csoportot is beiktatni. A táplálékkal való beadást alkalmazó vizsgálatok esetében a dózisintervallum nem lehet háromszorosnál nagyobb. A dózisszinteket a korábbi toxicitási adatok és különösen az ismételt dózisú vizsgálatok eredményeinek figyelembevételével kell megválasztani. A vizsgálandó vegyület és a szerkezetileg rokon anyagok metabolizmusával és kinetikájával kapcsolatban rendelkezésre álló összes információt is figyelembe kell venni. Ezek az információk segítik majd az adagolási rend megfelelő voltának igazolását is.

▼B

A kontrollcsoport egy kezeletlen csoport, vagy ha a vizsgálandó anyag beadásához vivőanyagot használnak, akkor egy vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgálandó anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Vivőanyag alkalmazása esetén a kontrollcsoportban a legnagyobb alkalmazott mennyiségben kell beadni a vivőanyagot. Ha a vizsgálandó anyagot a táplálékkal adják be, és emiatt csökken a táplálékfogyasztás vagy hasznosítás, akkor szükség lehet egy párban etetett kontrollcsoport alkalmazására is. A párhuzamos párban etetett kontrollcsoport helyett felhasználhatók olyan kontrollcsoportokkal végzett vizsgálatokból származó adatok is, amelyek célja a csökkent táplálékfogyasztás reproduktív paraméterekre gyakorolt hatásának értékelése.

A vivőanyagok vagy egyéb adalékok esetében a következő jellemzőket kell figyelembe venni: a vizsgálandó anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára vagy visszatartására gyakorolt hatások; a vizsgálandó anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt hatások, amelyek módosíthatják annak toxikus jellemzőit; valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások.

1.4.4. **Határérték-vizsgálat**

Ha egy egyetlen, legalább 1 000 mg/testtömeg-kg/nap orális dózis felhasználásával végzett, vagy táplálékkal vagy ivóvízzel történő beadás esetén a táplálékban vagy ivóvízben ezzel egyenértékű százalékos arány alkalmazásával történő és az itt ismertetett eljárások szerint lefolytatott vizsgálat sem a szülőkben, sem utódaikban nem idéz elő észlelhető toxicitást, és ha a szerkezetileg és/vagy metabolizmus szempontjából rokon vegyületekkel kapcsolatos adatok alapján nem várható toxicitás, megfontolható a több dózisszinttel végzett teljes vizsgálat elhagyása. Határérték-vizsgálatot kell minden esetben alkalmazni, kivéve, ha a humán expozíció magasabb orális dózis alkalmazását teszi szükségessé. Más típusú beadási módok, így például inhalálás vagy dermális alkalmazás esetén a vizsgálandó anyag fizikai-kémiai tulajdonságai – így például oldhatósága – gyakran előre jelezhetik, illetve korlátozhatják a lehetséges expozíciós szint maximumát.

1.4.5. **A dózisok beadása**

Az állatoknak a hét minden napján adagolni kell a vizsgálandó anyagot. A preferált beadási mód az orális (táplálékkal, ivóvízzel vagy mesterséges táplálással történő bevitel). Az ettől eltérő beadási módok használatát meg kell indokolni, és ennek megfelelő módosításokra is szükség lehet. A megfelelő hosszúságú kísérleti időszak során minden állatnak azonos módszerrel kell beadni az anyagot. Ha a vizsgálandó anyagot mesterséges táplálással juttatják be, gyomorszondát kell alkalmazni. Az egyszerre beadott folyadéktérfogat nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömegarányt (kukoricacsíra-olajban történő adagolás esetén a maximum a 0,4 ml/100 g testtömegarány), kivéve vizes oldatok esetében, amikor 2 ml/100 g testtömegarány is alkalmazható. Az irritáló vagy korróziós hatású anyagok kivételével, amelyek esetében a magasabb koncentrációk súlyosabb hatásokat okoznak, minimálisra kell csökkenteni a térfogatbeli eltéréseket, amihez a koncentrációt kell úgy beállítani, hogy minden dózisszinten állandó térfogatot lehessen biztosítani. A mesterséges táplálást alkalmazó vizsgálatokban a kölykök általában mindaddig csak közvetve, az anyatejen keresztül kapják a vizsgálandó anyagot, amíg az elválasztáskor meg nem kezdődik a közvetlen adagolás. A táplálékkal vagy ivóvízzel történő adagolást alkalmazó vizsgálatok esetében a kölykök közvetlenül is megkapják a vizsgálandó anyagot, amikor a szoptatási időszak utolsó hetében önállóan is elkezdenek táplálkozni.

▼B

A táplálékkal vagy ivóvízzel bejuttatott anyagok esetében fontos, hogy a vizsgálandó anyag mennyisége ne zavarja a normál táplálkozást vagy vízháztartást. Ha a vizsgálandó anyagot táplálékkal juttatják be, vagy a táplálékbeli koncentrációt (ppm), vagy pedig az állat testtömegére számított dózist kell állandó értéken tartani, és meg kell adni, hogy melyik alternatívát alkalmazzák. A mesterséges táplálással bejuttatott anyagok esetében a dózist mindig a nap hasonló időszakában kell beadni, és legalább hetente újra be kell állítani ahhoz, hogy az állat testtömegéhez viszonyítva állandó értéken lehessen tartani. A mesterséges táplálással bejuttatott és testtömegen alapuló dózis beállításakor figyelembe kell venni a méhlepénybeli eloszlással kapcsolatos információkat is.

1.4.6. **A kísérleti program**

A P generációba tartozó hímek és nőstények napi kezelését 5–9 hetes korukban kell elkezdeni. Az F1 hímek és nőstények napi kezelését az elválasztáskor kell elkezdeni; nem szabad megfeledkezni arról, hogy ha vizsgálandó anyagot táplálékkal vagy ivóvízzel adagolják, az F1 utódok közvetlen expozíciója már a szoptatási időszakban megkezdődhet. Az adagolást mindkét ivar (P és F1) esetében legalább 10 héten át folytatni kell a párzási időszak előtt. Az adagolást a 2 hetes pároztatási időszakban sem szabad abbahagyni egyik ivar esetében sem. Amikor a reproduktív hatások értékelése szempontjából már nincs szükség a hím állatokra, humánus módon exterminálni kell őket, és megvizsgálni. A szülői (P) generációba tartozó nőstények esetében az adagolást a vemhesség ideje alatt is folytatni kell, egészen az F1 generáció elválasztásáig. Fontolóra kell venni az adagolási rend módosítását a vizsgálandó anyaggal, ezen belül a meglévő toxicitási adatokkal, az anyagcsere fokozódásával vagy biológiai felhalmozódással kapcsolatban rendelkezésre álló információk alapján. Az egyes állatoknak beadandó dózist általában a legutóbbi testtömegmérés eredménye alapján kell meghatározni. A vemhesség utolsó trimeszterében azonban óvatosan kell eljárni a dózis beállításakor.

A P és F1 hímek és nőstények kezelését exterminálásukig kell folytatni. Minden felnőtt P és F1 hímet és nőstényt humánus módon exterminálni kell, ha már nincs rájuk szükség a reproduktív hatások értékeléséhez. Az elválasztás után a pároztatásra ki nem választott F1 utódokat és minden F2 utódot humánus módon exterminálni kell elválasztásukat követően.

1.4.7. **A pároztatási eljárás**

1.4.7.1. A szülői (P) generáció pároztatása

Minden egyes pároztatáskor a nőstényt egy azonos dózissal kezelt hímmel kell összerakni (1:1 pároztatás), és addig kell együtt hagyni őket, amíg a párzás meg nem történik, vagy 2 hét el nem telik. Minden nap meg kell vizsgálni, hogy a nőstényben észlelhető-e ondó vagy hüvelydugó. A vemhesség 0. napja definíció szerint az a nap, amikor hüvelydugó vagy ondó figyelhető meg a nőstényben. Ha a pároztatás sikertelen volt, fontolóra kell venni a nőstények újrapároztatását egy azonos csoportbeli és már sikeresen pároztatott hímmel. Az adatok között egyértelműen fel kell tüntetni a pároztatott párokat. Kerülni kell a testvérek pároztatását.

▼B

1.4.7.2. F1 pároztatás

Az F1 utódok pároztatásakor minden alomból legalább egy hím és egy nőstény állatot kell kiválasztani az elválasztáskor, hogy később egy másik alomból származó, de azonos csoportba tartozó állattal pároztatva létrejöjjön az F2 generáció. A kölykök kiválasztását minden egyes alomban véletlenszerűen kell elvégezni, feltéve, hogy nincs szignifikáns különbség az egy alomba tartozó állatok testtömege vagy külső megjelenése között. Ha azonban van különbség, akkor minden alomból a legreprezentatívabb egyedet kell kiválasztani. A gyakorlatban ezt a testtömeg alapján lehet a legjobban elvégezni, de esetenként megfelelőbb lehet a külső megjelenés alapján tenni ezt. Mindaddig nem szabad pároztatni az F1 utódokat, amíg teljesen ivaréretté nem válnak.

Az utód nélküli pároknál meg kell vizsgálni a látszólagos terméketlenség okát. Ennek keretében lehetőség biztosítható számukra más olyan hímekkel vagy nőstényekkel való párzásra, amelyeket már sikeresen pároztattak, vagy el lehet végezni a szaporítószervek mikroszkópos vizsgálatát, vagy meg lehet vizsgálni az ivari ciklust vagy a spermaképződést.

1.4.7.3. Második pároztatás

Bizonyos esetekben, így például ha az alomméret a kezeléssel összefüggésben megváltozik, vagy ha az első pároztatáskor nem egyértelmű hatásokat figyelnek meg, ajánlatos a felnőtt P és F1 állatokat újrapároztatni, és így egy második almot kialakítani. Ajánlatos újrapároztatni azokat a hímeket és nőstényeket is, amelyek bizonyítottan nemzőképes ellenkező nemű partnerekkel sem hoztak utódokat. Ha a két generáció bármelyikében szükségesnek látszik egy második alom kialakítása, az állatokat körülbelül egy héttel az utolsó alom elválasztása után kell újrapároztatni.

1.4.7.4. Az alom mérete

Hagyni kell, hogy az állatok a szokásos módon elljék és neveljék utódaikat az elválasztásig. Az alomméret standardizálása nem kötelező. Ha azonban elvégezzük a standardizálást, részletesen ismertetni kell az erre alkalmazott módszert.

1.5. MEGFIGYELÉSEK

1.5.1. **Klinikai megfigyelések**

Minden nap klinikai megfigyelést kell végezni, és a mesterséges táplálással való adagolás beadás időpontjának meghatározásakor azt is figyelembe kell venni, hogy a beadás után a hatások várhatóan mikor érik el a maximumukat. A viselkedésbeli változásokat, a nehéz vagy hosszan tartó ellés jeleit és a toxicitás minden tünetét rögzíteni kell a jegyzőkönyvben. Legalább hetente egyszer alaposabban is meg kell vizsgálni az állatokat, célszerűen akkor, amikor a testtömegmérésre kerül sor. Naponta kétszer, illetve a hétvégeken adott esetben naponta egyszer meg kell vizsgálni az állatokat megbetegedés és elhullás szempontjából.

▼B

1.5.2. **A szülők testtömege, valamint táplálék- és vízfogyasztása**

A kezelés első napján, majd azt követően legalább hetente egyszer meg kell mérni a szülők (P és Fl) testtömegét. Az anyaállatokat (P és F1) legalább a vemhesség 0., 7., 14. és 20. vagy 21. napján kell megmérni, a szoptatás időszakában pedig ugyanazokon a napokon, amikor az utódokat is megmérik, valamint az állatok exterminálásának napján is. A megfigyeléseket minden egyes felnőtt állat esetében külön-külön kell rögzíteni. A pároztatás előtti időszakban és a vemhesség alatt legalább hetente meg kell mérni a táplálékfogyasztást. Ha a vizsgálandó anyagot az ivóvízzel adagolják, legalább hetente egyszer a vízfogyasztást is meg kell mérni.

1.5.3. **Ivari ciklus**

Az ivari ciklus hosszát és szabályosságát hüvelykenet alkalmazásával kell meghatározni a P és F1 nőstényekben a pároztatás előtt és adott esetben a pároztatás során mindaddig, amíg be nem bizonyosodik, hogy párzás történt. A hüvelyi/méhnyaki sejtek vétele során vigyázni kell arra, hogy meg ne sérüljön a nyálkahártya, és ezáltal nehogy álvemhesség alakuljon ki (1).

1.5.4. **Spermaparaméterek**

A vizsgálat befejezésekor minden P és F1 hím esetében meg kell mérni a here és a mellékhere, valamint a kórszövettani vizsgálatokra megőrzött minden szerv közül az egyiknek a tömegét (lásd 1.5.7. és 1.5.8.1. szakasz). A P és F1 hímek minden egyes csoportjából egy-egy, legalább tíz hímből álló részhalmaz esetében a megmaradó heréket és mellékheréket a homogenizálásnak ellenálló spermatidák és mellékhere farki részében tárolt ondósejtek számlálására kell felhasználni. A hímek ugyanezen részhalmazában spermát kell gyűjteni a mellékhere farki részéből vagy az ondóvezetékből, amelyet a spermamotilitás és -morfológia vizsgálatára kell felhasználni. Ha kezeléssel összefüggő hatásokat észlelnek, vagy ha más vizsgálatok eredményei a spermaképződésre gyakorolt lehetséges hatásokra utalnak, a sperma értékelését az összes dóziscsoportban minden hímben el kell végezni; egyéb esetben elegendő lehet, ha a számlálást csak a kontroll- és a magas dózissal kezelt P és F1 hímekben végzik el.

Meg kell határozni a herében lévő homogenizálásnak ellenálló spermatidák és a mellékhere farki részében található ondósejtek teljes számát (2) (3). A mellékhere farki részében lévő ondókészlet nagyságát a kvalitatív értékelésekhez használt szuszpenzióban lévő ondó koncentrációja és mennyisége, valamint a fennmaradt mellékhere farki részéből kinyert szövet ezt követő darálásával és/vagy homogenizálásával kinyert ondósejtek száma alapján lehet meghatározni. Az összes kezelési csoportban közvetlenül az exterminálás után kell elvégezni a számlálást a hímek e kiválasztott részhalmazában, kivéve, ha video- vagy digitális felvételt készítenek, vagy ha a mintákat későbbi elemzésig lefagyasztják. Ilyen esetekben a kontroll- és a magas dózissal kezelt csoportot célszerű először megvizsgálni. Ha nem észlelhető kezeléssel összefüggő hatás (pl. az ondósejtszámra, valamint a motilitásra és morfológiára gyakorolt hatás), a többi dóziscsoportot nem kell megvizsgálni. Ha a magas dózissal kezelt csoportban kezeléssel összefüggő hatásokat észlelünk, akkor az alacsonyabb dóziscsoportokat is meg kell vizsgálni.

▼B

Az exterminálás után azonnal értékelni kell vagy videofelvételen rögzíteni kell a mellékheréből (vagy ondózsinórból) kinyert ondósejtek motilitását. A spermát a károsodások minimális szintre szorítása mellett kell kinyerni, majd elfogadható módszerek segítségével kell hígítani a motilitásvizsgálathoz (4). Az előre haladó mozgást mutató ondósejtek százalékos arányát vagy szubjektíven, vagy objektíven kell meghatározni. Ha számítógéppel támogatott motilitásvizsgálatot alkalmaznak (5) (6) (7) (8) (9) (10), az előre haladó mozgás levezetése az átlagos pályasebesség és egyenes vonalú mozgás vagy lineáris index felhasználó által beállított küszöbértékein alapul. Ha a boncoláskor a mintákról videofelvételt (11) készítenek, vagy a képeket más módon rögzítik, esetleg csak a kontroll- és a nagy dózissal kezelt P és F1 hímek esetében kell további elemzést végezni, kivéve ha kezeléssel összefüggő hatásokat észlelnek; ebben az esetben ugyanis az alacsonyabb dózissal kezelt csoportokat is értékelni kell. Videofelvétel vagy digitális képek hiányában a boncoláskor az összes kezelési csoportba tartozó valamennyi állat mintáját ki kell elemezni.

Egy mellékheréből (vagy ondóvezetékből) származó spermaminta morfológiai értékelését is el kell végezni. Az ondósejteket (mintánként legalább 200-at) fixált nedves preparátum (12) formájában kell megvizsgálni, és normálnak vagy rendellenesnek kell minősíteni. A morfológiai sperma-rendellenességek közé tartoznak például a fúzió, az izolált fejek és a torz fej és/vagy farok. Az értékelést a hímeknek az egyes dóziscsoportból kiválasztott részhalmazán, az állatok exterminálása után azonnal, vagy a video- vagy digitális felvételek alapján egy későbbi időpontban kell elvégezni. Fixálás után a keneteket is el lehet tenni későbbi elemzésre. Ilyen esetekben a kontroll- és magas dózissal kezelt csoportokat célszerű először megvizsgálni. Ha nem észlelnek kezeléssel összefüggő hatásokat (pl. az ondósejtek morfológiájára gyakorolt hatásokat), akkor nem kell elvégezni a többi dóziscsoport elemzését. Ha a magas dózissal kezelt csoportban kezeléssel összefüggő hatásokat tapasztalnak, akkor az alacsonyabb dózissal kezelt csoportokat is ki kell értékelni.

Ha a fenti spermavizsgálati paramétereket egy legalább 90 napos szisztémás toxicitási vizsgálatban már meghatározták, akkor a kétgenerációs vizsgálatban nem kell ezt feltétlenül megismételni. A P generáció spermamintáit vagy az azokról készült digitális felvételeket azonban, ha szükséges, ajánlatos az esetleges későbbi értékelések céljára megőrizni, illetve elmenteni.

1.5.5. **Az utódok**

Az ellés után minden almot a lehető leghamarabb meg kell vizsgálni (0. szoptatási nap) a kölykök számának és ivarának, a halvaszületések és élveszületések számának, valamint a makroszkópos rendellenességeknek a megállapítására. Ha nem történt maceráció, a 0. napon elhalva talált kölykökben lehetőség szerint meg kell vizsgálni az esetleges defektusokat, és meg kell állapítani az elhullás okát, majd konzerválni kell őket. Az élő kölyköket meg kell számolni, és meg kell mérni a testtömegüket a születéskor (0. szoptatási nap), vagy az 1. napon, majd ezt követően a rendszeres testtömegmérési napokon, azaz pl. a szoptatás 4., 7., 14. és 21 napján. Az anyaállatokban vagy az utódokban megfigyelt fizikai vagy viselkedésbeli rendellenességeket is fel kell jegyezni.

▼B

Az utódok fizikai fejlődését főleg a testtömeg-gyarapodás alapján kell nyomon követni. Az egyéb fizikai paraméterek (pl. a fülek és a szemek kinyílása, fogzás, szőrnövekedés) kiegészítő információkat szolgáltathatnak, de ezeket az adatokat lehetőleg a szexuális éréssel összefüggésben kell értékelni (pl. kor és testtömeg a hüvelykinyílás vagy a makk-fityma szétválás időpontjában) (13). Ha nem történtek korábban külön ilyen vizsgálatok, akkor ajánlatos az elválasztás előtt és/vagy után funkcionális vizsgálatokat (pl. motoros aktivitás, szenzoros működés, a reflexek kifejlődése) is végezni az F1 utódokon, különösen a szexuális éréssel kapcsolatos vizsgálatokat. Az elválasztott és pároztatásra kiválasztott F1 utódok esetében meg kell határozni azt az életkort, amikor a hüvelykinyílás, illetve a fitymaelválás megtörténik. Ha az F1 generáció ivararányában vagy az ivarérés idejében észlelt változások azt indokolják, a születés utáni 0. napon meg kell mérni az anogenitális távolságot az F2 utódokban.

Kihagyhatók a funkcionális vizsgálatokból azok a csoportok, amelyek egyébként egyértelműen káros hatások tüneteit mutatják (pl. a testtömeg-gyarapodás szignifikáns lassulása stb.). Funkcionális vizsgálatok végzése esetén a pároztatásra kiválasztott kölyköket nem szabad e vizsgálatokba bevonni.

1.5.6. **Makroszkópos boncolás**

A vizsgálat befejezésekor vagy a vizsgálat során történt elhullás esetén minden szülő (P és F1 állatok), minden külső rendellenességet vagy klinikai tüneteket mutató kölyök, valamint az F1 és az F2 generációból is egy-egy véletlenszerűen kiválasztott kölyök/ivar/alom esetében makroszkópos vizsgálatot kell végezni az esetleges strukturális rendellenességek vagy kórbonctani elváltozások feltárására. Külön figyelmet kell szentelni a szaporítószerveknek. Az elhullásközeli állapotba került, és ezért humánus módon exterminált vagy a nem macerált, elpusztult kölykökben meg kell határozni az esetleges defektusokat és/vagy az elhullás okát, majd konzerválni kell őket.

Az először ellő nőstények méhében kórszövettani értékelés nélkül kell megvizsgálni a beágyazódási helyek jelenlétét és számát.

1.5.7. **A szervek tömege**

A vizsgálat befejezésekor a P és F1 állatoknál meg kell határozni a testtömeget, valamint az alábbi szervek tömegét (a páros szervek tagjait külön-külön kell megmérni):

— méh, petefészkek,

— herék, mellékherék (teljes és farki rész),

— prosztata,

— ondóhólyagok a koaguláló mirigyekkel és váladékukkal, valamint a prosztata (egy egységként),

— agy, máj, vese, lép, agyalapi mirigy, pajzsmirigy és mellékvese, valamint az ismert célszervek.

Meg kell határozni a boncolásra kiválasztott F1 és F2 kölykök végső testtömegét. Az egyetlen véletlenszerűen kiválasztott kölyök/ivar/alom (lásd 1.5.6. szakasz) esetében az alábbi szervek tömegét kell megmérni: agy, lép és csecsemőmirigy.

▼B

Ha megoldható, a makroszkópos boncolási eredményeket és a szervtömeg-adatokat a más, ismételt dózisú vizsgálatokban tett megfigyelésekkel összefüggésben kell értékelni.

1.5.8. **Kórszövettan**

1.5.8.1. A szülőállatok

A szülőállatokban (P és F1) a következő szerveket és szöveteket vagy az ezekből készített reprezentatív mintákat fixálni kell a kórszövettani vizsgálatokhoz, majd megfelelő közegben el kell eltárolni:

— hüvely, méh és méhnyak, valamint petefészkek (megfelelő rögzítőszerrel fixálva),

— egy here (Bouin-féle vagy hasonló rögzítőszerben tartósítva), egy mellékhere, ondóhólyagok, prosztata és koaguláló mirigy,

— a pároztatásra kiválasztott összes P és F1 állatból származó, korábban meghatározott célszerv(ek).

Minden kontroll- és nagy dózissal kezelt csoportban el kell végezni a pároztatásra kiválasztott P és F1 állatok fent felsorolt és konzervált szerveinek és szöveteinek teljes körű kórszövettani vizsgálatát. A P állatok petefészkének vizsgálata nem kötelező. A NOAEL meghatározásának elősegítése érdekében a kezeléssel összefüggő változásokat mutató szerveket az alacsony és közepes dózissal kezelt csoportokban is meg kell vizsgálni. El kell végezni továbbá azon alacsony és közepes dózissal kezelt állatok szaporítószerveinek kórszövettani vizsgálatát, amelyek gyaníthatóan csökkent termékenységgel bírnak, így például azok esetében, amelyek nem tudtak párzani, megfoganni, utódokat nemzeni vagy egészséges utódokat a világra hozni, vagy amelyeknél az ivari ciklusra vagy a spermaszámra, spermamotilitásra vagy spermamorfológiára gyakorolt hatásokat észleltek. Minden makroszkópos léziót, így például atrófiát vagy daganatot is meg kell vizsgálni.

A kezeléssel összefüggő hatások, így például a visszatartott spermatidák, hiányzó csírasejtrétegek vagy típusok, sokmagvú óriássejtek, vagy a spermaképző sejtek leválása és lumenbe kerülésének azonosítása érdekében el kell végezni a here részletes kórszövettani vizsgálatát (pl. Bouin-féle rögzítőszer, paraffinba ágyazás és 4–5 μm vastag harántmetszetek) (14). Az ép mellékhere vizsgálatának ki kell terjednie a mellékhere feji részére, testére és farki részére, amelyet egy hosszanti metszet értékelésével lehet elvégezni. A mellékherében meg kell vizsgálni a leukocita infiltrációt, a sejttípusok gyakoriságában bekövetkező változásokat, az abnormális sejttípusokat, valamint az ondósejek fagocitózisát. A hím szaporítószervek vizsgálatára PAS- és hematoxilin-festés alkalmazható.

A szoptatási időszak után a petefészeknek tüszőkezdeményeket és növekvő tüszőket kell tartalmaznia, valamint egy nagyméretű laktációs sárgatestet. A kórszövettani vizsgálat során meg kell vizsgálni a tüszőkezdemény-állomány kvalitatív deplécióját. Az F1 nőstények esetében el kell végezni a tüszőkezdemények kvantitatív értékelését is; az állatok számának, a kiválasztott petefészekmetszeteknek és -metszetmintáknak az alkalmazott értékelési eljáráshoz statisztikai szempontból adekvátnak kell lennie. A kezelt és kontrollpetefészkek összehasonlításához a vizsgálatoknak ki kell terjedniük a tüszőkezdemények összeszámlálására, amelyekhez hozzá lehet venni a kis növekvő tüszőket is (15) (16) (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2. Az elválasztott állatok

A külső rendellenességeket vagy klinikai tüneteket mutató összes kölykök, valamint az F1 és az F2 generációból az egy véletlenszerűen kiválasztott és pároztatásra ki nem jelölt kölyök/ivar/alom makroszkóposan rendellenes szöveteit és célszerveit fixálni kell, majd megfelelő közegben el kell ezeket tárolni a kórszövettani vizsgálatokhoz. A konzervált szövetek teljes kórszövettani vizsgálatát úgy kell elvégezni, hogy külön hangsúlyt kell fektetni a szaporítószervekre.

2. **ADATOK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Az adatokat egyedileg kell a jelentésben rögzíteni, majd táblázatos formában is össze kell foglalni, amelyben minden egyes vizsgálati csoport és generáció esetében fel kell tüntetni az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a vizsgálat során elpusztult vagy humánus okok miatt exterminált állatok számát, az elhullások és humánus okok miatti exterminálások időpontját, a termékeny állatok számát, a vemhes nőstények számát, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ezen belül bármely toxikus tünet megjelenésének időpontját, valamint ezek időtartamát és súlyosságát, a szülőkkel és az utódokkal kapcsolatos megfigyelések típusait, a kórszövettani változások típusait és az almokra vonatkozó minden idevágó adatot.

A számszerű eredményeket megfelelő, általánosan elfogadott statisztikai módszerrel kell kiértékelni; a statisztikai módszereket a vizsgálat megtervezésének keretében kell kiválasztani, és meg is kell azt indokolni. Az adatok elemzéséhez célszerű lehet dózis-válasz statisztikai modelleket alkalmazni. A jelentésnek elegendő információt kell tartalmaznia az alkalmazott elemzési módszerrel és számítógépes programmal kapcsolatban ahhoz, hogy egy független bíráló vagy statisztikus újra tudja értékelni vagy rekonstruálni tudja az elemzést.

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A kétgenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat eredményeit a megfigyelt hatások, ezen belül a boncolási és mikroszkópos eredmények szempontjából kell értékelni. Az értékelés során ki kell térni a vizsgálandó anyag dózisa és a rendellenességek, ezen belül a makroszkópos léziók, az azonosított célszervek, a csökkent termékenység, a klinikai rendellenességek, a csökkent reproduktív teljesítmény vagy alomszám, a testtömegváltozások, a mortalitásra gyakorolt hatások és egyéb toxikus hatások megléte vagy hiánya, illetve gyakorisága és súlyossága közötti összefüggésekre vagy ezek hiányára. A vizsgálati eredmények értékelésekor figyelembe kell venni a vizsgálandó anyag fizikai-kémiai tulajdonságait és az esetlegesen rendelkezésre álló toxikokinetikai adatokat is.

Egy megfelelően elvégzett reprodukciós toxicitási vizsgálat alapján kielégítő becslés tehető a hatást nem okozó szintre vonatkozóan, és megismerhetők a reprodukcióra, ellésre, szoptatásra, posztnatális fejlődésre, ezen belül a növekedésre és szexuális fejlődésre gyakorolt hatások.

▼B

2.3. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A kétgenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat információkkal szolgál valamely anyagnak a szaporodási ciklus összes fázisában történő, ismételt expozíciója hatásairól. A vizsgálat különösen a reproduktív paraméterekkel, valamint az utódok fejlődésével, növekedésével, érésével és túlélésével kapcsolatban ad információkat. A vizsgálat eredményeit a szubkrónikus, prenatális fejlődési, toxikokinetikai és egyéb vizsgálatok eredményeivel összefüggésben kell értelmezni. A vizsgálat eredményeit fel lehet használni annak felmérésére is, hogy szükség van-e egy vegyület további vizsgálataira. A vizsgálat eredményeinek emberre történő extrapolálása csak korlátozott mértékben érvényes. A vizsgálat leginkább arra alkalmazható, hogy információt nyerjünk a hatást nem okozó szintekkel és megengedhető humán expozícióval kapcsolatban (20) (21) (22) (23).

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

— fizikai jelleg és ahol fontos, fizikai-kémiai tulajdonságok,

— azonosító adatok,

— tisztaság.

Vivőanyag (ha szükséges):

— ha a vivőanyag nem víz, akkor ennek indoklása.

Kísérleti állatok:

— a felhasznált faj/törzs,

— az állatok száma, életkora és ivara,

— származás, tartási körülmények, takarmány, fészekrakó anyagok stb.,

— az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetén.

Kísérleti körülmények:

— a dózisszintek megválasztásának indoklása;

— a vizsgálandó anyag formulázásával/a táplálék előkészítésével, az elért koncentrációval kapcsolatos információk;

— a készítmény stabilitása és homogenitása,

— a vizsgálandó anyag adagolására vonatkozó adatok,

— adott esetben a vizsgálandó anyag táplálékban/ivóvízben lévő koncentrációjának (ppm) átszámítása a tényleges dózisra (mg/testtömeg-kg/nap),

— a táplálék és az ivóvíz minőségével kapcsolatos információk.

▼B

Eredmények:

— táplálékfogyasztási és – ha van – vízfogyasztási adatok, táplálékhasznosítási képesség (egy gramm elfogyasztott táplálékra számított testtömeg-növekedés) és vizsgálandó anyag felvétele a P és F1 állatok esetében, kivéve az együttes tartás időszakát és legalább a szoptatási időszak utolsó harmadát,

— felszívódási adatok (ha vannak),

— a pároztatásra kiválasztott P és F1 állatok testtömegadatai,

— az almok és a kölykök testtömegadatai,

— a testtömeg az exterminálásкor, valamint a szülői generáció abszolút és relatív szervtömegadatai,

— a klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (visszafordíthatóság),

— a vizsgálat során bekövetkező elhullás időpontja, illetve hogy az állatok életben maradtak-e az exterminálásig,

— toxikus válaszadatok ivaronként és dózisonként, ezen belül a párzás, a termékenység, a vemhesség, a születés, az életképesség és a szoptatás mérőszámai; a jelentésben fel kell tüntetni a mérőszámok kiszámításához felhasznált adatokat,

— a szaporodásra, az utódokra, a posztnatális növekedésre stb. gyakorolt toxikus vagy egyéb hatások,

— boncolási eredmények,

— az összes kórszövettani lelet részletes ismertetése,

— a szabályos ciklust mutató P és F1 nőstények száma, és a ciklusok időtartama,

— teljes ondósejtszám a mellékhere farki részében, az előrehaladó mozgást végző ondósejtek százalékos aránya, morfológiailag normál ondósejtek százalékos aránya és az azonosított rendellenességet mutató ondósejtek százalékos aránya,

— a pároztatás időtartama, ezen belül a párzásig eltelt napok száma,

— a vemhesség időtartama,

— a beágyazódások és sárgatestek száma, az almok mérete,

— az élveszületések száma és a beágyazódás utáni veszteség,

— a makroszkóposan látható rendellenességeket mutató kölykök száma, és ha meghatározták, akkor a csökött utódok számát is fel kell tüntetni a jelentésben,

— a kölykökben meghatározott fizikai tájékozódási pontokkal kapcsolatos adatok és más posztnatális fejlődési adatok; a kiértékelt fizikai tájékozódási pontokat meg is kell indokolni,

— adott esetben a kölykökben és felnőtt állatokban végzett funkcionális megfigyelésekkel kapcsolatos adatok,

— adott esetben az eredmények statisztikai elemzése.

▼B

Az eredmények diszkussziója.

Következtetések, ezen belül az anyai és utódhatásokra vonatkozó NOAEL-értékek.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(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 17:298303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421–426.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379–383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and 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. TOXIKOKINETIKAI VIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 417. vizsgálati iránymutatásában (2010) leírt módszerrel. A vizsgált vegyi anyag toxikokinetikai vizsgálatára irányuló tanulmányok célja a vegyi anyag felszívódásával, eloszlásával, biotranszformációjával (azaz metabolizmusával) és kiürülésével kapcsolatos megfelelő információk megszerzése, a megfigyelt toxicitás és a koncentráció vagy a dózis közötti összefüggés meghatározásának, valamint a toxicitás mechanizmusa megértésének elősegítése. A toxikokinetika a vizsgált állatok vizsgált vegyi anyagnak való szisztémás kitettségének bizonyítása, valamint a keringésbe került molekularészek (kiindulási vegyi anyagok/metabolitok) meghatározása révén hozzájárulhat a toxikológiai vizsgálatok értelmezéséhez. Az e vizsgálatok alapján meghatározott alapvető toxikokinetikai paraméterek információt szolgáltatnak továbbá a vizsgált vegyi anyag szövetekben és/vagy szervekben történő felhalmozódásra, valamint a vizsgált vegyi anyagnak való kitettség eredményeként bekövetkező biotranszformáció előidézésére való képességéről.

2. A toxikokinetikai adatok hozzájárulhatnak az állati toxicitással kapcsolatos adatok emberi veszély- és/vagy kockázatértékelés céljából történő extrapolálásra való alkalmasságának és relevanciájának értékeléséhez. A toxikokinetikai vizsgálatok hasznos információt szolgáltathatnak továbbá a toxicitási vizsgálatokhoz szükséges dózisszintek (lineáris, illetve nem lineáris kinetika), a beadási módok okozta hatások, a biológiai hozzáférhetőség, valamint a vizsgálati tervvel kapcsolatos kérdések meghatározásához. A toxikokinetikai adatok bizonyos típusai felhasználhatók élettani alapú toxikokinetikai (PBTK) modellek kidolgozásához.

3. A metabolit-/toxikokinetikai adatok fontos felhasználási területei közé tartozik például a lehetséges toxicitások és hatásmechanizmusok feltárása, valamint ezek dózisszinthez és expozíciós útvonalhoz való viszonyának meghatározása. A metabolizmussal kapcsolatos adatok emellett olyan információkat szolgáltathatnak, amelyek hasznosak lehetnek a vizsgált vegyi anyag exogén módon termelt metabolitjainak való kitettség toxikológiai jelentőségének értékelésében.

4. A megfelelő toxikokinetikai adatok hasznosak lehetnek a mennyiségi szerkezet-hatás összefüggések, a vegyi anyagok biztonsági értékelése csoportosításos vagy read across módszer alapján történő megközelítése további elfogadhatóságának és alkalmazhatóságának támogatása szempontjából. A kinetikai adatok felhasználhatók továbbá egyéb (például *in vivo*/*in vitro*) vizsgálatok toxikológiai relevanciájának értékelésében is.

5. Amennyiben a szöveg más bejuttatási útvonalat nem említ (lásd különösen a 74–78. bekezdést), a jelen vizsgálati módszert a vizsgált vegyi anyag szájon át történő bejuttatására kell alkalmazni.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

6. A szabályozási rendszerek különböző követelményeket és igényeket támasztanak a vegyi anyagok különböző osztályainak (például növényvédő szerek, biocid anyagok, ipari vegyszerek) toxikokinetikájával kapcsolatos végpontok és paraméterek mérésével szemben. A legtöbb vizsgálati módszerrel ellentétben ez a vizsgálati módszer toxikokinetikai vizsgálatot határoz meg, amely több mérést és végpontot foglal magában. A jövőben több új vizsgálati módszer és/vagy iránymutatás kidolgozására kerülhet sor minden egyes végpont külön-külön és részletesebben történő leírása érdekében. A jelen vizsgálati módszer esetében az elvégzendő vizsgálatokat vagy értékeléseket az egyes szabályozási rendszerek követelményei és/vagy igényei határozzák meg.

▼M4

7. Számos vizsgálat végezhető el egy vizsgált vegyi anyag toxikokinetikai viselkedésének szabályozási célú értékelése érdekében. Meghatározott szabályozási igényektől vagy helyzetektől függően azonban nem feltétlenül szükséges az összes lehetséges vizsgálatot elvégezni a vizsgált vegyi anyag értékeléséhez. A toxikokinetikai vizsgálatok tervezését rugalmasan, a szóban forgó vizsgált vegyi anyag jellemzőinek figyelembevételével kell megközelíteni. Bizonyos esetekben csak néhány kérdést szükséges feltárni a vizsgált vegyi anyaggal összefüggésbe hozható veszélyességi vagy kockázati problémák megoldásához. Bizonyos helyzetekben a toxikokinetikai adatok egyéb toxikológiai vizsgálatok értékelésének részeként gyűjthetők össze. Más esetekben további és/vagy kiterjedtebb toxikokinetikai vizsgálatok szükségesek a szabályozási igényektől függően és/vagy ha új kérdések merülnek fel a vizsgált vegyi anyag értékelése során.

8. A vizsgálat elvégzése előtt a vizsgálati laboratóriumnak a vizsgált vegyi anyagra, valamint az ahhoz kapcsolódó metabolitokra és analóg vegyületekre vonatkozó összes rendelkezésre álló információt figyelembe kell vennie a vizsgálat minőségének javítása és a szükségtelen állatkísérletek elkerülése érdekében. Ebbe beletartozhatnak egyéb releváns vizsgálati módszerek (*in vivo* vizsgálatok, *in vitro* vizsgálatok és/vagy *in silico* értékelések) adatai. A fizikai és kémiai tulajdonságok – úgymint a (log P_{OW}-ként kifejezett) oktanol-víz megoszlási hányados, a pKa, a vízoldékonyság, a gőznyomás, valamint a vegyi anyag molekulatömege – hasznosak lehetnek a vizsgálat tervezése és az eredmények értelmezése szempontjából. Ezek a megfelelő vizsgálati módszereknél leírt módszerek használatával határozhatók meg.

KORLÁTOK

9. Ez a vizsgálati módszer nem alkalmas speciális körülmények között, például vemhes vagy szoptató állatoknál vagy fiatal állatoknál, vagy a vizsgált anyagnak kitett élelmiszertermelő állatokban lévő lehetséges maradványok értékelése céljából való alkalmazásra. A B.36. vizsgálatból szerzett adatok azonban háttér-információt szolgáltathatnak az ilyen vizsgálatokhoz szükséges konkrét tanulmányok tervezéséhez. A jelen vizsgálati módszer nem nanoanyagok vizsgálatára szolgál. Az OECD vizsgálati iránymutatásainak nanoanyagokra történő alkalmazhatóságára vonatkozó előzetes felülvizsgálatról szóló jelentés szerint a 147. vizsgálati iránymutatás (amely a jelen B.36. vizsgálati módszerrel egyenértékű) nem alkalmazható nanoanyagokra (1).

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

10. A jelen vizsgálati módszer alkalmazásában használt fogalommeghatározások a függelékben találhatók.

ÁLLATJÓLLÉTI SZEMPONTOK

11. Az állatokkal való kíméletes bánásmódra vonatkozóan az OECD 19. iránymutatásában (2) található útmutatás. Ajánlott az OECD 19. iránymutatásának alkalmazása a jelen vizsgálati módszerben meghatározott összes *in vivo* és *in vitro* vizsgálat esetében.

A MÓDSZEREK LEÍRÁSA

Előzetes vizsgálatok

12. A toxikokinetikai vizsgálatok kísérleti paramétereinek megválasztása érdekében (például metabolizmus, tömegmérleg, analitikai eljárások, dózismeghatározás, CO_2 kilégzése stb.) előzetes vizsgálatok elvégzése javasolt. E paraméterek némelyikének jellemzése nem feltétlenül teszi szükségessé a radioizotóppal megjelölt vegyi anyagok használatát.

▼M4

Az állatok kiválasztása

Faj

13. A toxikokinetikai vizsgálatokhoz használt állatfaj (és törzs) lehetőleg ugyanaz legyen, mint amelyet az adott vizsgált vegyi anyaggal elvégzett egyéb toxikológiai vizsgálatokhoz használunk. Általában a patkányt kell használni, mivel ezt a fajt széles körben alkalmazzák a toxikológiai vizsgálatokhoz. Egyéb vagy további fajok használata abban az esetben indokolt, ha kritikus toxikológiai vizsgálatok bizonyítják az e fajokban megfigyelhető jelentős toxicitást, vagy ha e fajok toxicitási/toxikokinetikai szempontból hasonlóbbak az emberhez. Az állatfaj és a törzs megválasztását indokolni kell.

14. Amennyiben a vizsgálati módszer más fajt nem említ, a jelen vizsgálati módszer alkalmazásában vizsgálati faj alatt a patkány értendő. A módszer egyes szempontjai más vizsgálati fajok használata esetén módosításra szorulhatnak.

Életkor és törzs

15. Egészséges, fiatal, ivarérett (általában az adagolás időpontjában 6–12 hetes) állatokat kell használni a vizsgálat során (lásd még a 13. és 14. bekezdést). Amennyiben az állatok nem fiatal, ivarérett egyedek, használatukat indokolni kell. Az összes állatnak hasonló életkorúnak kell lennie a vizsgálat kezdetekor. Az egyes állatok súlya nem térhet el ± 20 %-nál nagyobb mértékben a vizsgált csoport átlagértékétől. A használt törzsnek ideális esetben meg kell egyeznie a vizsgált vegyi anyag toxikológiai adatbázisának előállításához használt törzzsel.

Az állatok száma és neme

16. Minden egyes vizsgált dózishoz legalább négy, azonos nemű állat szükséges. A felhasznált állatok nemére vonatkozó döntést indokolni kell. Meg kell fontolni mindkét nem (négy hím és négy nőstény) használatát, ha a nemek között jelentős különbségek bizonyíthatóak a toxicitás vonatkozásában.

Tartási és etetési körülmények

17. A vizsgálati időszak alatt az állatokat általában külön-külön kell tartani. Különleges körülmények között indokolt lehet a csoportos tartás. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérséklete 22 °C (± 3 °C), relatív páratartalma 30–70 % között kell, hogy legyen. Az etetéshez hagyományos laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

Vizsgált vegyi anyag

18. A tömegmérleg és a metabolitok meghatározásához C^{14} radioizotóppal megjelölt vizsgált vegyi anyagot kell használni, azonban nem szükséges a radioizotóppal megjelölt vizsgált vegyi anyag használata, ha az alábbiak bizonyíthatók:

— a tömegmérleg- és metabolitmeghatározás megfelelően értékelhető a nem jelölt vizsgált vegyi anyag használatával,

— a nem radioaktív vizsgált vegyi anyag használatán alapuló módszer analitikai specifikussága és érzékenysége megegyezik vagy nagyobb annál, amelyet a radioizotóppal jelölt vizsgált vegyi anyag használatával lehetett volna elérni.

▼M4

Egyéb radioaktív és stabil izotópok is használhatók, különösen abban az esetben, ha az adott elem a vizsgált vegyi anyag toxikus részéért felelős vagy annak részét képezi. Amennyiben lehetséges, a radioizotópos jelölésnek a molekula olyan, központi részében kell elhelyezkednie, amely metabolikusan stabil (nem kicserélhető, anyagcsere útján nem távozik CO_2-ként, és nem válik a szervezet egy szénatomos csoportjának részévé). A vizsgált vegyi anyag metabolikus útjának nyomon követése céljából a molekula több területének vagy meghatározott régióinak jelölése is szükséges lehet.

19. A radioizotóppal jelölt és nem jelölt vizsgált vegyi anyagokat a megfelelő módszerek alkalmazásával kell elemezni a tisztaság és az azonosság meghatározása érdekében. A radioaktív vizsgált vegyi anyag radiokémiai tisztaságának az adott vizsgált vegyi anyagnál elérhető legmagasabbnak (ideális esetben 95 %-nál nagyobbnak) kell lennie, és ésszerű erőfeszítéseket kell tenni a 2 %-os vagy annál nagyobb arányú szennyeződések azonosítása érdekében. A tisztaságot, valamint minden azonosított szennyeződés meghatározását és arányát jegyzőkönyvezni kell. Egyes szabályozási programok további iránymutatást adhatnak a keverékekből összetevődő vizsgált vegyi anyagok meghatározásának és specifikációjának, valamint a tisztaság meghatározására szolgáló módszerek kialakításának támogatása érdekében.

A dózis megválasztása

Előzetes vizsgálat

20. Általában egyetlen, szájon át beadott dózis elegendő az előzetes vizsgálathoz. A dózis nem lehet toxikus, de elég magasnak kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye a kiürülő anyagokból (és adott esetben plazmából) történő metabolitmeghatározást, valamint ahhoz, hogy megfeleljen az előzetes vizsgálat kitűzött céljának a jelen vizsgálati módszer 12. bekezdése szerint.

Fő vizsgálatok

21. A fő vizsgálatokhoz legalább két dózis javasolt, mivel a legalább két dózis-csoportból nyert információk segítséget nyújthatnak a dózisok más toxikológiai vizsgálatokban történő meghatározásához, valamint segíthetnek a már rendelkezésre álló toxicitási vizsgálatok dózis-válasz összefüggésének értékelésében.

22. Két dózis bejuttatása esetén mindkét dózisnak elég magasnak kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye a szervezetből kiürülő anyagokból (és adott esetben plazmából) történő metabolitmeghatározást. A dózis megválasztásakor figyelembe kell venni a rendelkezésre álló toxicitási adatokból származtatott információkat. Ha nem áll rendelkezésre információ (például a toxicitás klinikai tüneteit rögzítő akut orális toxicitási vizsgálatokból vagy ismételt dózisú toxicitási vizsgálatokból), a magasabb dózisként egy, a becsült LD_{50} értéknél (szájon át vagy bőrön át történő bejuttatás) vagy LC_{50} értéknél (belégzésen keresztül történő bejuttatás) alacsonyabb, vagy az akut toxicitási tartomány legkisebb becsült értékénél alacsonyabb érték fontolható meg. Az alacsonyabb dózisnak a magasabb dózis valamely hányadának kell lennie.

23. Amennyiben csak egy dózisszintet vizsgálunk, a dózisnak ideális esetben elég magasnak kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye a kiürülő anyagokból (és adott esetben plazmából) történő metabolitmeghatározást anélkül, hogy megfigyelhető toxicitást okozna. A második dózisszint kihagyását indokolni kell.

24. Ha a dózis kinetikai folyamatokra gyakorolt hatását kell meghatározni, lehetséges, hogy két dózis nem elegendő, és legalább az egyik dózisnak elég magasnak kell lennie e folyamatok telítéséhez. Ha a plazmakoncentráció-idő görbe alatti terület a fő vizsgálatban használt valamely két dózisszint között nem lineáris, az annak a határozott jele, hogy egy vagy több kinetikai folyamat telítődése valahol a két dózisszint között következik be.

▼M4

25. Az alacsony toxicitású vizsgált vegyi anyagok esetében a maximális dózis 1 000 mg/testsúlykilogramm (szájon és bőrön át történő bejuttatás) (belégzés útján történő bejuttatás esetén e melléklet B.2. fejezete ad iránymutatást, az ez esetben alkalmazott dózis általában nem haladja meg a 2 mg/l mennyiséget). Az adott vegyi anyaggal összefüggő szempontok a szabályozási igényektől függően magasabb dózist tehetnek szükségessé. A dózis megválasztását minden esetben indokolni kell.

26. A felhalmozódás és/vagy maradandóság lehetőségének meghatározásához elegendőek lehetnek az egyszeri dózisú vizsgálatokból származó toxikokinetikai és szöveti eloszlási adatok. Bizonyos körülmények között azonban ismételt dózis bejuttatása válhat szükségessé i. a felhalmozódás és/vagy maradandóság vagy a toxikokinetikai változások (azaz például az enzimindukció és -inhibíció) lehetőségének teljesebb körű meghatározása céljából, vagy ii. ha az alkalmazandó szabályozási rendszer megköveteli. Az ismételt adagolású vizsgálatok esetében az ismételt alacsony dózis beadása ugyan általában elegendő, bizonyos körülmények között azonban a magas dózis megismétlése is szükséges lehet (lásd még az 57. bekezdést).

A vizsgált vegyi anyag bejuttatása

27. A vizsgált vegyi anyagot homogén módon kell feloldani vagy szuszpendálni a vizsgált vegyi anyaggal elvégzett más orális szondás toxicitási vizsgálatoknál alkalmazott vivőanyagban, amennyiben a vivőanyagra vonatkozó információk rendelkezésre álnak. A vivőanyag megválasztását indokolni kell. A választott vivőanyagot és a dózis mértékét figyelembe kell venni a vizsgálat tervezésekor. A hagyományos bejuttatási módszer a szájon át történő szondatáplálás, azonban bizonyos helyzetekben előnyös lehet a zselatinkapszulával vagy étrendi keverékként történő bejuttatás (mindkét esetben indokolás szükséges). Az egyes állatoknak ténylegesen beadott dózist meg kell erősíteni.

28. A szájon át történő szondatáplálás révén egyszerre bejuttatandó folyadék maximális mennyisége a vizsgált állatok méretétől, a dózis vivőanyagának típusától, valamint attól függ, hogy az etetést felfüggesztjük-e a vizsgált vegyi anyag bejuttatása előtt. Az adagolás előtti etetést vagy annak korlátozását indokolni kell. A mennyiséget általában a lehető legalacsonyabb szinten kell tartani a vizes és nem vizes vivőanyagok esetében is. Rágcsálók esetében a dózis mennyisége rendszerint nem haladhatja meg a 10 ml/testsúlykilogrammot. A zsírban jobban oldódó vizsgált vegyi anyagokhoz használt vivőanyag mennyisége 4 ml/testsúlykilogrammnál is kezdődhet. Ismételt adagolás esetén, amikor a napi táplálékmegvonás nem javasolt, alacsonyabb dózismennyiségek (például 2-4 ml/testsúlykilogramm) alkalmazását kell megfontolni. Amennyiben lehetséges, megfontolható a vizsgált vegyi anyaggal elvégzett egyéb, szájon át történő szondatáplálásos vizsgálatok során bejuttatott dózisnak megfelelő mennyiség használata.

29. A biológiai hozzáférhetőség vagy a szájon át történő relatív felszívódás meghatározásához alkalmazható a vizsgált vegyi anyag intravénás bejuttatása, valamint a vizsgált vegyi anyag vérben és/vagy kiürülő anyagokban történő mérése. Az intravénás vizsgálat esetében a vizsgált vegyi anyag egyszeri (az alacsonyabb, szájon át bejuttatott dózissal általában megegyező, de azt meg nem haladó – lásd a dózis megválasztására vonatkozó részt) dózisát juttatjuk be a megfelelő vivőanyag használatával. Ezt az anyagot a megfelelő mennyiségben (például 1 ml/testsúlykilogramm) kell bejuttatni legalább négy, megfelelő nemű állat választott bejuttatási területén (indokolt esetben mindkét nem is használható, lásd a 16. bekezdést). A vizsgált vegyi

▼M4

anyag intravénás bejuttatásához teljesen feloldódott vagy szuszpendált dózis-készítmény szükséges. Az intravénás bejuttatáshoz használt vivőanyag nem befolyásolhatja a vér integritását vagy a véráramlást. Ha a vizsgált vegyi anyagot infúzióval juttatjuk be, az infúzió adagolását jegyzőkönyvezni és az egyes állatok között egységesíteni kell, feltéve, hogy infúziós pumpát használunk. Érzéstelenítést kell használni, ha kanült helyezünk a nyaki vénába (a vizsgált vegyi anyag bejuttatásához és/vagy vérvételhez), vagy ha a vegyi anyagot a combverőéren keresztül juttatjuk be. Az érzéstelenítés típusára kellő figyelmet kell fordítani, mivel hatással lehet a toxikokinetikára. Az állatok számára lehetővé kell tenni a megfelelő felépülést a vizsgált vegyi anyag és a vivőanyag bejuttatását megelőzően.

30. Bizonyos vizsgált vegyi anyagok esetében egyéb bejuttatási útvonalak – például a bőrön vagy belégzésen keresztüli bejuttatás (lásd a 74–78. bekezdést) – alkalmazhatók azok fizikai és kémiai tulajdonságainak, valamint a várt emberi használat vagy kitettség figyelembevételével.

Mérések

Tömegmérleg

31. A tömegmérleget a bejuttatott (radioaktív) dózis vizelettel, széklettel és kilélegzett levegővel kiürülő százalékának, valamint a szövetekben, elhullott állatokban és ketreclemosóban jelen lévő százalékának összeadásával határozzuk meg (lásd a 46. bekezdést). Általában a bejuttatott vizsgált vegyi anyag (radioaktivitás) 90 %-nál nagyobb mennyiségének visszanyerése tekinthető megfelelőnek.

Felszívódás

32. A felszívódás kezdeti becslése úgy kapható meg, hogy kihagyjuk a dózis emésztőrendszerben és/vagy a székletben lévő százalékát a tömegmérleg meghatározásából. A felszívódás százalékos arányának számítási módját lásd a 33. bekezdésben. A kiürülés vizsgálatához lásd a 44–49. bekezdést. Ha a szájon át történő adagolást követő felszívódás pontos mértékét nem lehet meghatározni a tömegmérleg-vizsgálatokkal (például ha a bejuttatott dózis több mint 20 %-a található meg a székletben), további vizsgálatok lehetnek szükségesek. Ezek a vizsgálatok vagy 1) a vizsgált vegyi anyag beadásából és a vizsgált vegyi anyag epében történő méréséből, vagy 2) a vizsgált vegyi anyag szájon át vagy intravénásan történő bejuttatásából és a vizsgált vegyi anyag vizeletben, valamint a kilélegzett levegőben és az elhullott állatokban jelen lévő nettó mennyiségének mindkét bejuttatási mód tekintetében történő méréséből állnak. Mindkét vizsgálati tervben a vizsgált vegyi anyag és a metabolitok vegyszerspecifikus elemzésére szolgáló helyettesítő módszerként elvégezzük a radioaktivitás mérését.

33. Az epén keresztüli kiürülés vizsgálata során általában a szájon át történő bejuttatást alkalmazzuk. A vizsgálat során kanült kell vezetni legalább négy, megfelelő nemű (vagy indokolt esetben mindkét nemből választott) állat epevezetékébe, és a vizsgált vegyi anyag egyszeri dózisát kell bejuttatni. A vizsgált vegyi anyag bejuttatását követően a radioaktivitás/vizsgált vegyi anyag epén keresztüli kiürülését addig kell megfigyelni, ameddig az szükséges a bejuttatott dózis ezen útvonalon kiürülő százalékának becsléséhez, amely alapján a következőképpen közvetlenül kiszámítható a szájon át történő felszívódás mértéke:

$$\text{Százalékos felszívódás} = \frac{(\text{epében} + \text{vizeletben} + \text{kilélegzett levegőben} + \text{elhullott állatokban lévő mennyiség, az emésztőrendszerben lévő mennyiséget leszámítva})}{\text{bejuttatott mennyiség}} \times 100$$

34. A vizsgált vegyi anyagok néhány osztálya esetében a felszívódott dózis közvetlen kiürülése fordulhat elő a bélcsatorna membránjai között. Ilyen esetekben a százalékos dózis azon patkány székletében a szájon át történő adagolást követően végzett mérése, amelynek az epevezetékébe kanült vezettünk, nem tekinthető reprezentatívnak a nem felszívódott dózis szempontjából. Amennyiben vélhetően bélcsatornán keresztüli kiürülés is előfordulhat, ajánlott a dózis százalékos felszívódását a szájon át történő és az intravénás bejuttatást követő kiürülés (érintetlen vagy kanülözött epevezetékű patkány) összehasonlításából kiszámított felszívódás alapján meghatározni (lásd a 35. bekezdést). Amennyiben a bélcsatornán keresztüli kiürülés mennyiségének meghatározását szükségesnek ítéljük, ajánlott a kanülözött epevezetékű patkányból történő kiürülés intravénás bejuttatást követő mérése is.

▼M4

Biológiai hozzáférhetőség

35. A biológiai hozzáférhetőséget az orális és intravénás csoportok plazmájának/vérének kinetikája alapján lehet meghatározni az 50–52. bekezdésben leírtak szerint, a vizsgált vegyi anyag és/vagy a megfelelő metabolitok speciális kémiai elemzése útján, így ez esetben nincs szükség radioizotóppal jelölt vizsgált vegyi anyag használatára. A vizsgált vegyi anyag vagy a megfelelő metabolit(ok) biológiai hozzáférhetősége (F) a következőképen számítható ki:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dózis_{IV}/Dózis_{exp})$$

ahol az AUC a plazmakoncentráció-idő görbe alatti terület, az exp pedig a kísérleti útvonal (szájon át, bőrön át vagy belégzéssel történő adagolás).

36. A szisztémás hatások kockázatfelmérésében történő használatkor a toxikus összetevő biológiai hozzáférhetősége általában elsőbbséget élvez a százalékos felszívódással szemben az állatkísérletekből megállapított szisztémás koncentrációk és a munkahelyi kitettséggel kapcsolatos vizsgálatokból származó analóg biomonitoring-adatok összehasonlítása során. A helyzet összetettebbé válhat, ha a dózisok a nem lineáris tartományban vannak, fontos tehát, hogy a toxikokinetikai szűréssel a lineáris tartományban lévő dózisokat határozzuk meg.

Szöveti eloszlás

37. A vizsgált vegyi anyag és/vagy metabolitjai szövetekben történő eloszlásának ismerete fontos a célszövetek meghatározása, valamint a toxicitás mögöttes mechanizmusainak megértése szempontjából, továbbá a vizsgált vegyi anyag és a metabolit felhalmozódási vagy megmaradási képességével kapcsolatos információk megszerzése céljából. A teljes (radioaktív) dózis szövetekben, valamint az elhullott állatokban lévő százalékos arányát legalább a kiürülési kísérlet befejezésekor (például általában az adagolást követő 7 napig, vagy a vizsgált vegyi anyagra jellemző viselkedéstől függően rövidebb ideig) kell mérni. Ha a vizsgálat befejezésekor nem észlelhető vizsgált vegyi anyag a szövetekben (például mert a vizsgált vegyi anyag annak rövid felezési ideje miatt kiürülhetett a vizsgálat befejezése előtt), megfelelő körültekintéssel kell eljárni az adatok félreértelmezésének megelőzése érdekében. Ebben a helyzetben a szöveti eloszlást akkor kell vizsgálni, amikor a vizsgált vegyi anyag (és/vagy metabolit) plazmában/vérben lévő koncentrációja a legmagasabb (T_{max}), vagy amikor a vizeleten keresztül történő kiürülés mennyisége a legmagasabb (lásd a 38. bekezdést). A vizsgált vegyi anyag és/vagy metabolitjai szövetekben történő eloszlásának meghatározása, (adott esetben) az időtől való függőség értékelése, a tömegmérleg meghatározásának elősegítése érdekében és/vagy az illetékes hatóság előírásai szerint a szövetek további időpontokban történő gyűjtésére is szükség lehet. A begyűjtendő szövetek közé tartoznak a májszövetek, a zsírszövetek, az emésztőrendszerből származó szövetek, a vese-, lép-, teljesvér-szövetek, az elpusztult állatokból származó szövetek, a célszervből származó szövetek, valamint bármely egyéb szövet (például pajzsmirigyszövetek, eritrociták, szaporítószervekből származó szövetek, bőrszövetek, szemszövetek [különösen a pigmentált állatokból]), amely jelentőséggel bírhat a vizsgált vegyi anyag toxikológiai értékelése szempontjából. Meg kell fontolni további szövetek ugyanazon időpontokban történő elemzését az állatok lehető legteljesebb felhasználása céljából, valamint abban az esetben, ha célszervi toxicitás figyelhető meg szubkrónikus és krónikus toxicitási vizsgálatokban. A (radioaktív) maradvány koncentrációját, valamint a szövet-plazma (vér) arányt is jegyzőkönyvezni kell.

38. Szükséges lehet, vagy az illetékes hatóság előírhatja, hogy a plazma/vér megfelelő kinetikai vagy kiürülési kísérletei alapján megállapított szöveti eloszlást további időpontokban is értékeljük, például akkor, amikor a plazmában/vérben lévő koncentráció a legmagasabb (például T_{max}), vagy amikor a vizeleten keresztül történő kiürülés mennyisége a legmagasabb. Ezen információk hasznosak lehetnek a toxicitás megértése, valamint a vizsgált vegyi anyag és a metabolit felhalmozódási és megmaradási képességének meghatározása szempontjából. A minták megválasztását indokolni kell; az elemzendő mintáknak általában meg kell egyezniük a fent említettekkel (lásd a 37. bekezdést).

▼M4

39. A radioaktivitás szöveti eloszlási vizsgálatokhoz szükséges mennyiségi meghatározását szervboncolás, homogenizáció, oxidáció és/vagy oldhatóvá tétel segítségével lehet elvégezni, amelyet a befogott maradványok folyadékszcintillációs számlálása (LSC) követ. Bizonyos, jelenleg a fejlesztés különböző stádiumaiban lévő technikák – például a mennyiségi egésztest-autoradiográfia és a mikroszkópos receptor-autoradiográfia – hasznosnak bizonyulhatnak a vizsgált vegyi anyag szervekben és/vagy szövetekben történő eloszlásának maghatározása szempontjából (3) (4).

40. A szájon át történő bejutás kivételével az expozíciós útvonalak tekintetében meghatározott szöveteket kell gyűjteni és elemezni, például tüdőszöveteket az inhalációs vizsgálatok során és bőrszöveteket a bőrön át történő bejutással kapcsolatos vizsgálatok során. Lásd a 74–78. bekezdést.

Metabolizmus

41. A változatlan vizsgált vegyi anyag, valamint a metabolitok azonosításához és mennyiségének meghatározásához a kiürülő anyagok (és adott esetben plazma) összegyűjtése szükséges a 44–49. bekezdésben leírtak szerint. A kiürülő anyagok metabolitok egy adott dóziscsoporton belüli meghatározásának elősegítése céljából történő összevonása megengedhető. Ajánlatos az egyes időszakokból származó metabolitok profiljának meghatározása. Ha azonban a minta és/vagy radioaktivitás hiánya ezt kizárja, a több időpontban gyűjtött vizelet és széklet összevonása megengedhető, de a több nemhez vagy dózishoz tartozó vizeleté és székleté nem. Megfelelő minőségi és mennyiségi módszerek használata szükséges a kezelt állatok vizeletének, székletének, kiürült radioaktivitásának és adott esetben epéjének vizsgálatához.

42. Ésszerű erőfeszítéseket kell tenni a bejuttatott dózis 5 vagy nagyobb százalékában jelen lévő összes metabolit azonosságának meghatározása, valamint a vizsgált vegyi anyag metabolikus rendszerének meghatározása érdekében. A kiürülő anyagokban a bejuttatott dózis 5 vagy több százalékában jelen lévő vizsgált vegyi anyagoknakmeg kell határozni az azonosságát. Az azonosság meghatározása az összetevők pontos strukturális meghatározását jelenti. Az azonosság meghatározása általában vagy a metabolit ismert standardokkal való, két lényegileg különböző rendszer használatával végzett együttes kromatográfiájával, vagy pozitív strukturális azonosításra alkalmas technikákkal, például tömegspektrometriával, magmágneses rezonanciával (NMR) stb. történik. Együttes kromatográfia esetén nem tekinthetők a metabolit azonossága megfelelő kétmódszeres ellenőrzési módszerének azok a kromatográfiai technikák, amelyek ugyanazt az állófázist használják két különböző oldószerrendszerrel, mivel a két módszer nem független egymástól. Az azonosság együttes kromatográfiával történő meghatározását két különböző, analitikailag egymástól független rendszerrel, például reverz és normál fázisú vékonyréteg-kromatográfiával (TLC) vagy nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) kell elvégezni. Spektroszkópiai módszerekkel végzett további megerősítés nem szükséges, ha a kromatográfiai szeparáció megfelelő minőségű. Alternatív módszerként az azonosság egyértelmű meghatározása strukturális információkat szolgáltató módszerek, például folyadékkromatográfia/tömegspektrometria (LC-MS), vagy folyadékkromatográfia/tandem tömegspektrometria (LC-MS/MS), gázkromatográfia/tömegspektrometria (GC-MS) és NMR-spektometria alkalmazásával is elvégezhető.

43. Ha a bejuttatott dózis 5 vagy nagyobb százalékában jelen lévő metabolitok azonosságának meghatározása nem lehetséges, a zárójelentésben ezt meg kell indokolni/magyarázni. Ahhoz, hogy a vizsgált vegyi anyaggal kapcsolatos veszélyek és/vagy kockázatok elemzéséhez az anyagcsere-útvonalakat alaposabban is megismerhessük, helyénvaló lehet a bejuttatott dózis kevesebb mint 5 %-át kitevő mennyiségben jelen lévő metabolitok azonosságát is meghatározni. Ahol csak lehetséges, strukturális megerősítést is kell végezni. Ez magában foglalhatja a plazmában vagy vérben, vagy más szövetekben történő profilmeghatározást.

▼M4

Kiürülés

44. A bejuttatott dózis kiürülésének sebességét és mértékét a vizeletből, székletből és kilélegzett levegőből visszanyert (radioaktív) dózis százalékos arányának mérésével kell meghatározni. Ezek az adatok segítenek a tömegmérleg meghatározásában is. A vizeleten, székleten és kilélegzett levegőn keresztül távozó vizsgált vegyi anyag (radioaktivitás) mennyiségét megfelelő időközönként kell meghatározni (lásd a 47–49. bekezdést). Az ismételt dózisú kísérleteket úgy kell megtervezni, hogy azok a 26. bekezdésben meghatározott célkitűzések elérése érdekében lehetővé tegyék a kiürülési adatok összegyűjtését. Ez lehetővé teszi az egyszeri dózisú kísérletekkel történő összehasonlítást.

45. Ha az előzetes vizsgálat eredményei azt mutatják, hogy nem ürül ki jelentős mennyiségű vizsgált vegyi anyag (radioaktivitás) a kilélegzett levegővel (a 49. bekezdés szerint), akkor a fő vizsgálat során nem szükséges a kilélegzett levegő összegyűjtése.

46. A kiürülő anyagok (vizelet, széklet, kilélegzett levegő) gyűjtéséhez minden állatot külön metabolikus egységbe kell helyezni. Az egyes gyűjtési időszakok végén (lásd a 47–49. bekezdést) a metabolikus egységeket át kell mosni megfelelő oldószerrel (úgynevezett „ketreclemosóval”) a vizsgált vegyi anyag (radioaktivitás) maximális visszanyerése érdekében. A kiürülő anyagok gyűjtésével 7 nap után kell felhagyni, vagy azután, hogy a bejuttatott dózis legalább 90 %-át visszanyertük, attól függően, hogy melyik következik be előbb.

47. A vizsgált vegyi anyag (radioaktivitás) vizeletben jelen lévő teljes mennyiségét a gyűjtés első napján legalább két időpontban kell meghatározni, amelyek közül az egyiknek az adagolást követő 24. órában kell történnie, azt követően pedig a vizsgálat befejezéséig naponta. Az első napon érdemes lehet kettőnél több mintavételi időpontot is kijelölni (például a 6., a 12. és a 24. órában). Az alternatív, illetve a további gyűjtési időpontokat az előzetes vizsgálatok eredményei alapján kell kijelölni. A gyűjtés ütemezését indokolni kell.

48. A vizsgált vegyi anyag (radioaktivitás) székletben jelen lévő teljes mennyiségét, hacsak az előzetes vizsgálatok eltérő vagy további gyűjtési időpontokat nem indokolnak, naponta kell meghatározni a vizsgálat befejezéséig, első alkalommal az adagolást követő 24. órában. Az ettől eltérő gyűjtési ütemezést indokolni kell.

49. A kilélegzés útján távozó CO_2 és egyéb illékony anyagok gyűjtését meg kell szakítani az adott vizsgálatban, ha egy 24 órás gyűjtési időszak alatt a bejuttatott dózis kevesebb mint 1 %-át találjuk a kilélegzett levegőben.

Az időbeli lefolyással kapcsolatos vizsgálatok

A plazma/vér kinetikája

50. E vizsgálatok célja a vizsgált vegyi anyag alapvető toxikokinetikai paramétereinek (például C_{max}, T_{max}, felezési idő [$t_{1/2}$], AUC) becslése. Ezek a vizsgálatok egy dózissal, vagy – gyakrabban – két vagy több dózissal végezhetők el. A dózis beállítását a kísérlet jellege és/vagy a vizsgálat célja határozza meg. A kinetikai adatok olyan kérdések megválaszolásához lehetnek szükségesek, mint a vizsgált vegyi anyag biológiai hozzáférhetősége és/vagy a dózis kiürülésre gyakorolt hatásának meghatározása (például annak meghatározása, hogy a kiürülés dózistól függően telítődik-e).

51. Ezekhez a vizsgálatokhoz dóziscsoportonként legalább négy, azonos nemű állatot kell használni. A felhasznált állatok nemére vonatkozó döntést indokolni kell. Meg kell fontolni mindkét nem (négy hím és négy nőstény) használatát, ha a rendelkezésre álló adatok alapján a nemek között jelentős különbségek feltételezhetők a toxicitás vonatkozásában.

▼M4

52. A (radioizotóppal jelölt) vizsgált vegyi anyag bejuttatása után megfelelő mintavételi módszertan alkalmazásával megfelelő időpontokban minden állattól vérmintát kell venni. Az állatonként levehető vérminták mennyiségét és számát korlátozhatja az ismételt mintavételnek az állat egészségére/fiziológiájára gyakorolt lehetséges hatása és/vagy az analitikai módszer érzékenysége. A mintákat minden egyes állatra vonatkozóan kell elemezni. Bizonyos körülmények között (például a metabolitok jellemzőinek meghatározásakor) több állattól származó minták összevonására lehet szükség. Az összevont mintákat egyértelműen azonosítani kell, és az összevonást indokolni kell. Amennyiben radioizotóppal jelölt vizsgált vegyi anyagot használunk, megfelelő lehet a jelen lévő teljes radioaktivitás elemzése. Ebben az esetben a teljes radioaktivitást a teljes vérben és plazmában, vagy a plazmában és a vörösvérsejtekben kell elemezni, ami lehetővé teszi a vér/plazma arány kiszámítását. Más körülmények között a kiindulási vegyület és/vagy a metabolitok azonosítását igénylő konkrétabb vizsgálatok, vagy a fehérjekötés vizsgálatának elvégzése lehet szükséges.

Egyéb szövetek kinetikája

53. E vizsgálatok célja időbeli lefolyással kapcsolatos információk megszerzése olyan szempontokkal összefüggő kérdéseknek a vizsgált vegyi anyag különböző szövetekben lévő szintjeinek meghatározása révén történő megválaszolása céljából, mint a toxikus hatásmechanizmus, a bioakkumuláció és a bioperzisztencia. A szövetek megválasztása és az értékelt időpontok száma a megválaszolandó kérdéstől és a vizsgált vegyi anyagra vonatkozó toxikológiai adatbázistól függ. E további, szövetek kinetikájával kapcsolatos vizsgálatok megtervezésekor figyelembe kell venni a 37–40. bekezdésben leírtak szerint összegyűjtött információkat. Ezek a vizsgálatok egyszeri vagy ismételt adagolással végezhetők el. A választott megközelítést részletesen indokolni kell.

54. A szövetek kinetikájával kapcsolatos egyéb vizsgálatok elvégzésének okai többek között a következők lehetnek:

— bizonyíték a vérben megfigyelhető hosszabb felezési időre, ami a vizsgált vegyi anyag különböző szövetekben történő lehetséges felhalmozódására utal, vagy

— annak vizsgálatához fűződő érdek, hogy kialakult-e egy állandósult állapot bizonyos szövetekben (az ismételt dózisú vizsgálatokban például annak ellenére, hogy a vizsgált vegyi anyag nyilvánvaló állandósult állapota már kialakulhatott a vérben, érdekek fűződhetnek annak megerősítéséhez, hogy a célszövetekben is kialakult az állandósult állapot).

55. Az ilyen típusú, időbeli lefolyással kapcsolatos vizsgálatok esetén a vizsgált vegyi anyag megfelelő dózisát időpontonként és dózisonként legalább négy állatnak kell szájon át beadni, és az eloszlás időbeli lefolyását meg kell figyelni a választott szövetekben. Csak az egyik nem egyedei használhatók, hacsak nem figyelhető meg egy adott nemre jellemző toxicitás. A megválaszolandó kérdéstől is függ, hogy a teljes radioaktivitást, vagy a kiindulási vegyületet és/vagy a metabolitokat elemezzük-e. A szöveteken belüli eloszlást a megfelelő technikák alkalmazásával kell vizsgálni.

Enzimindukció/-inhibíció

56. A vizsgált vegyi anyag enzimindukciójának/-inhibíciójának vagy biotranszformációjának lehetséges hatásaival foglalkozó vizsgálatokra akkor lehet szükség, ha az alábbi feltételek közül egy vagy több fennáll:

1. a rendelkezésre álló bizonyítékok a vizsgált vegyi anyag biotranszformációja és a megnövekedett toxicitás közötti kapcsolatra utalnak;

2. a rendelkezésre álló toxicitási adatok a dózis és a metabolizmus közötti nem lineáris kapcsolatra utalnak;

▼M4

3. a metabolitok azonosítására irányuló vizsgálatok egy potenciálisan toxikus metabolit meghatározását eredményezték, amelyet a vizsgált vegyi anyag által előidézett enzimfolyamat hozhatott létre;

4. olyan hatásokra keresünk magyarázatot, amelyek feltételezhetően enzimindukciós jelenségekkel függnek össze;

5. ha a vizsgált vegyi anyag metabolitprofiljában különböző fajokkal vagy különböző körülmények között elvégzett *in vitro* vagy *in vivo* kísérletek révén toxikológiai szempontból jelentős váltakozások figyelhetőek meg, szükség lehet az érintett enzim(ek) (például 1-es fázisú enzimek, úgymint a citokróm P450-függő monooxigenáz rendszer izoenzimei, 2-es fázisú enzimek, úgymint a szulfotranszferáz vagy az uridin-difoszfát-glükuroniltranszferáz izoenzimei, vagy bármely más, ide tartozó enzim) jellemzőinek meghatározására. Ezek az információk felhasználhatók a fajok közötti extrapoláció megfelelőségének értékeléséhez.

57. A vizsgált vegyi anyaggal összefüggő toxikokinetikai változások értékelésére megfelelően validált és indokolt vizsgálati protokollokat kell alkalmazni. A példaként megemlíthető vizsgálati tervek a jelöletlen vizsgált vegyi anyag ismételt adagolását, azt követően pedig a radioizotóppal jelölt vizsgált vegyi anyag 14. napon történő egyszeri adagolását, vagy a radioizotóppal jelölt vizsgált vegyi anyag ismételt adagolását és az 1., 7. és 14. napon a metabolitprofilok meghatározása céljából végzett mintavételt foglalják magukban. A radioizotóppal jelölt vizsgált vegyi anyag ismételt adagolása információkat szolgáltathat a bioakkumulációról is (lásd a 26. bekezdést).

KIEGÉSZÍTŐ MEGKÖZELÍTÉSEK

58. A jelen vizsgálati módszerben leírt *in vivo* kísérleteken túlmutató kiegészítő megközelítések hasznos információkat szolgáltathatnak a vizsgált vegyi anyag bizonyos fajokban végbemenő felszívódásával, eloszlásával, metabolizmusával vagy kiürülésével kapcsolatban.

***In vitro* információk használata**

59. A vizsgált vegyi anyag metabolizmusával kapcsolatos számos kérdés megválaszolható megfelelő vizsgálati rendszereket alkalmazó *in vitro* vizsgálatok segítségével. A májból származó, frissen izolált vagy tenyésztett hepatociták és szubcelluláris frakciók (például mikroszómák és citoszol vagy S9 frakció) felhasználhatók az esetleges metabolitok vizsgálatához. A célszervben, például a tüdőben végbemenő helyi metabolizmus vizsgálata hasznos lehet a kockázatértékelés szempontjából. Ebből a célból hasznosak lehetnek a célszövetek mikroszómás frakciói. A mikroszómákkal végzett vizsgálatok hasznosak lehetnek a lehetséges nembeli és életkorbeli különbségek meghatározása, valamint az enzimparaméterek (K_m és V_{max}) jellemzőinek meghatározása szempontjából, amelyek segítséget nyújthatnak a metabolizmus dózisfüggőségének kitettségi szintek vonatkozásában történő vizsgálatához. A mikroszómák hasznosak lehetnek továbbá a vizsgált vegyi anyag metabolizmusában részt vevő egyes mikroszómás enzimek azonosításában, ami a fajok közötti extrapoláció szempontjából lehet lényeges (lásd még az 56. bekezdést). A biotranszformáció előidézésének lehetősége is vizsgálható a szóban forgó vizsgált vegyi anyaggal előkezelt állatok májából származó szubcelluláris frakciók (például mikroszómák és citoszol) használatával, *in vitro* kísérletekben hepatocitaindukció alapján, vagy a megfelelő enzimeket kimutató egyes sejtvonalakon keresztül. Bizonyok körülmények között és a megfelelő feltételek mellett emberi szövetekből származó szubcelluláris frakciók használatát is fontolóra lehet venni a biotranszformációval kapcsolatban a fajok között esetlegesen fennálló különbségek meghatározásához. Az *in vitro* vizsgálatok eredményei hasznosak lehetnek a PBTK-modellek kidolgozása szempontjából is (5).

▼M4

60. A bőrön keresztüli felszívódással kapcsolatos *in vitro* vizsgálatok kiegészítő információkat szolgáltathatnak a felszívódás jellemzőinek meghatározásához (6).

61. A májsejtekből származó elsődleges sejttenyészetek és a friss szövetszeletek felhasználhatók a májmikroszómákra vonatkozókhoz hasonló kérdések megválaszolásához. Bizonyos esetekben meghatározott kérdések a megfelelő enzimet határozottan kimutató sejtvonalak vagy mesterséges sejtvonalak használatával is megválaszolhatók lehetnek. Bizonyos esetekben hasznos lehet egyes citokróm P450 izoenzimek (például CYP1A1, 2E1, 1A2 és más enzimek) és/vagy 2-es fázisú enzimek kiindulási vegyület általi inhibíciójának és indukciójának *in vitro* kísérletek révén történő vizsgálata. Az így szerzett információk hasznosak lehetnek a hasonló szerkezetű vegyületek szempontjából.

Toxicitásvizsgálatokból származó toxikokinetikai adatok kiegészítő információként történő használata

62. A bármely más toxicitásvizsgálat során gyűjtött vér-, szövet-, és/vagy kiürülőanyag-minták elemzése adatokat szolgáltathat a biológiai hozzáférhetőségről, a plazmakoncentráció időbeli változásáról (AUC, C_{max}), a bioakkumulációs képességről, a kiürülési sebességről, valamint a metabolizmus és kinetika nemtől vagy életkortól függő változásairól.

63. A vizsgálati terv figyelembevétele felhasználható az alábbiakkal kapcsolatos kérdések megválaszolásához: a felszívódás telítődése, biotranszformáció vagy kiürülési útvonalak magasabb dózisszinteknél, új anyagcsere-útvonalak működése magasabb dózisoknál, valamint a toxikus metabolitok korlátozása magasabb dózisoknál.

64. Az egyéb veszélyértékelési megfontolások közé tartozhatnak a következők:

— életkorral összefüggő érzékenység a vér-agy gát, a vese és/vagy a detoxikációs képesség állapotában fennálló különbségek miatt,

— szubpopulációra jellemző érzékenység a biotranszformációs képességben fennálló vagy egyéb toxikokinetikai különbségek miatt,

— a magzat vagy újszülött kitettsége a vegyszerek placentán, illetve szoptatáson keresztüli átvitele révén.

Toxikokinetikai modellezés alkalmazása

65. A toxikokinetikai modellek hasznosak lehetnek a veszélyesség- és kockázatértékelés különböző szempontjai, például a szisztémás kitettség és a belső szövetdózis előrejelzése tekintetében. Ezenkívül a hatásmechanizmussal kapcsolatos egyes kérdések is megválaszolhatók, és ezek a modellek a fajok közötti extrapoláció, az expozíciós útvonalak, az adagolási sémák és a humán kockázatértékelés alapjául szolgálhatnak. Az adott vizsgált vegyi anyag bármely fajra vonatkozó PBTK-modelljeinek kidolgozásához többek között a következő adatok lehetnek hasznosak: 1) megoszlási hányadosok, 2) biokémiai állandók és fiziológiai paraméterek, 3) útvonalspecifikus felszívódási paraméterek és 4) a modellek értékeléséhez használt *in vivo* kinetikai adatok (például a megfelelő [> 10 %] kiválasztódási folyamatokhoz tartozó kiürülési paraméterek, a metabolizmus vonatkozásában a K_m és a V_{max}). A modellek kidolgozásához felhasznált kísérleti adatokat tudományos szempontból megalapozott módszerekkel kell előállítani, és az előállított modelleket validálni kell. A vizsgált vegyi anyagtól és a fajtól függő paramétereket, például a felszívódási arányokat, a vér-szövet megoszlást és a metabolizmus gyorsaságának állandóit gyakran határozzuk meg a nem kompartment és az élettani alapú modellek kidolgozásának elősegítése céljából (7).

▼M4

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

66. Ajánlott tartalomjegyzéket készíteni a vizsgálati jegyzőkönyvhöz.

A jegyzőkönyv törzse

67. A jegyzőkönyv törzsének a jelen vizsgálati módszerben leírt információkat kell tartalmaznia, amelyeket az alábbiak szerint kell szakaszokra és bekezdésekre tagolni:

Összefoglalás

68. A vizsgálati jegyzőkönyv e részének tartalmaznia kell a vizsgálati terv összefoglalását, valamint az alkalmazott módszerek leírását. Az összefoglalásban ki kell emelni a tömegmérleggel, a metabolitok jellegével és mennyiségével, a szövetmaradványokkal, a kiürülés sebességével, a bioakkumulációs képességgel, a nemek szerinti különbségekkel stb. kapcsolatos fő megállapításokat is. Az összefoglalásnak kellően részletesnek kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye a megállapítások értékelését.

Bevezetés

69. A jegyzőkönyv e részének tartalmaznia kell a vizsgálat célkitűzéseit, indokolását és tervét, valamint a megfelelő hivatkozásokat és az esetleges előzményeket.

Anyagok és módszerek

70. A jegyzőkönyv e részének tartalmaznia kell az összes lényeges információ, többek között az alábbiak részletes leírását:

a) Vizsgált vegyi anyag

Ennek az alszakasznak tartalmaznia kell a vizsgált vegyi anyag meghatározását: kémiai név, molekuláris szerkezet, a kémiai összetétel minőségi és mennyiségi meghatározása, kémiai tisztaság, valamint lehetőség szerint az esetleges szennyeződések típusa és mennyisége. Információkat kell tartalmaznia továbbá a fizikai/kémiai tulajdonságokkal, többek között a fizikai halmazállapottal, színnel, bruttó oldhatósággal és/vagy megoszlási hányadossal, stabilitással, valamint adott esetben a maró hatással kapcsolatban. Adott esetben az izomerekkel kapcsolatos információkat is fel kell tüntetni. Ha a vizsgált vegyi anyag radioizotóppal jelölt, ennek az alszakasznak a következőkre vonatkozó információkat is tartalmaznia kell: a radioizotóp típusa, a jelölés helye, fajlagos aktivitás és radiokémiai tisztaság.

A vizsgált vegyi anyag bejuttatásához használt bármilyen vivőanyag, hígítószer, szuszpendáló anyag és emulgeálószer, vagy más anyag típusát vagy leírását is meg kell adni.

b) Kísérleti állatok

Ennek az alszakasznak a kísérleti állatokra vonatkozó információkat kell tartalmaznia, beleértve a faj, a törzs és a vizsgálat kezdetekori életkor megválasztását és ennek indokolását, az állatok nemét, valamint testsúlyát, egészségi állapotát és az állattartás módját.

c) Módszerek

Ennek az alszakasznak részleteznie kell a vizsgálati tervet és az alkalmazott módszertant. Tartalmaznia kell az alábbiak leírását:

(1) adott esetben az expozíciós útvonal és expozíciós körülmények bármilyen módosításának indokolása;

▼M4

(2) a dózisszintek megválasztásának indokolása;

(3) az utóvizsgálatok kísérleti tervezéséhez használt előzetes vizsgálatok leírása, ha voltak ilyenek. Be kell nyújtani az előzetes vizsgálatot alátámasztó adatokat;

(4) az adagoló oldat elkészítésének módja, valamint a felhasznált oldószer vagy vivőanyag típusa, ha van ilyen;

(5) a kezelt csoportok száma és az állatok száma csoportonként;

(6) adagolási szintek és mennyiségek (valamint radioaktivitás használata esetén a dózis fajlagos aktivitása);

(7) bejuttatási útvonal(ak) és módok;

(8) az adagolás gyakorisága;

(9) táplálékmegvonási időszak (ha van ilyen);

(10) teljes radioaktivitás állatonként;

(11) az állatok tartása;

(12) a minták gyűjtése és kezelése;

(13) a metabolitok szétválasztásához, mennyiségének meghatározásához és azonosításához használt analitikai módszerek;

(14) az alkalmazott módszerek kimutatási határa;

(15) az alkalmazott egyéb kísérleti mérések és eljárások (beleértve a metabolitelemzéshez használt módszerek validációját).

d) Statisztikai elemzés

Ha a vizsgálat megállapításait statisztikai elemzés útján értékeljük, elegendő információt kell megadni az elemzési módszerre és az alkalmazott számítógépes programra vonatkozóan ahhoz, hogy egy független bíráló/statisztikus újra tudja értékelni vagy rekonstruálni tudja az elemzést.

A rendszermodellezési vizsgálatok, például a PBTK-vizsgálatok esetében a modellek bemutatásának tartalmaznia kell a modell teljes leírását a modell független rekonstrukciójának és validációjának lehetővé tétele érdekében (lásd a 65. bekezdést és a Függelék: Fogalommeghatározások című részt).

Eredmények

71. Ebben a szakaszban az összes adatot össze kell foglalni és táblázatba kell rendezni a megfelelő statisztikai értékeléssel együtt, valamint szövegesen le kell írni. A radioaktivitás számlálásával kapcsolatos adatokat a vizsgálatnak megfelelő módon kell összefoglalni és bemutatni, általában mikrogramm vagy milligramm egyenérték/minta tömege egységekben, de más egységek is használhatók. Ennek a szakasznak tartalmaznia kell a megállapítások grafikus ábrázolását, a reprezentatív kromatográfiai és spektrometriai adatok reprodukcióját, a metabolitok meghatározását/számszerűsítését, valamint a várható anyagcsere-útvonalakat, beleértve a metabolitok molekuláris szerkezetét. Ennek a szakasznak adott esetben az alábbi információkat is tartalmaznia kell:

(1) A vizeletből, székletből, kilélegzett levegőből, valamint a ketreclemosóban talált vizeletből és székletből visszanyert radioaktivitás mennyisége és százalékos aránya.

— Bőrvizsgálatok esetén a kezelt bőrből, bőrlemosókból visszanyert vizsgált vegyi anyaggal, valamint a bőrt takaró eszközön és a metabolikus egységen visszamaradt radioaktivitással kapcsolatos adatokat, továbbá a bőrlemosási vizsgálat eredményeit is meg kell adni. További részleteket lásd a 74–77. bekezdésben.

▼M4

— Inhalációs vizsgálatok esetén a tüdőből és az orrszövetekből visszanyert vizsgált vegyi anyaggal kapcsolatos adatokat is meg kell adni (8). További részleteket lásd a 78. bekezdésben.

(2) A bejuttatott dózis százalékaként kifejezett szöveti eloszlás és koncentráció (mikrogramm egyenértékek/a szövet grammban kifejezett súlya), valamint a szövet-vér vagy szövet-plazma arány,

(3) a testszövetek és kiürülő anyagok vizsgálatát magában foglaló egyes vizsgálatokból kiszámított anyagmérleg,

(4) plazmakoncentráció és toxikokinetikai paraméterek (biológiai hozzáférhetőség, AUC, Cmax, Tmax, kiürülés, felezési idő) a megfelelő expozíciós útvonal(ak)on keresztül történő bejuttatást követően,

(5) a vizsgált vegyi anyag felszívódásának sebessége és mértéke a megfelelő expozíciós útvonal(ak)on keresztül történő bejuttatást követően,

(6) a vizsgált vegyi anyag és metabolitok kiürülő anyagokból gyűjtött mennyisége (a bejuttatott dózis százalékában kifejezve),

(7) hivatkozás a függelék adataira, amelyek magukban foglalják az egyes állatok összes mérési végpontra vonatkozó adatait (például dózis bejuttatása, százalékos visszanyerés, koncentrációk, toxikokinetikai paraméterek stb.),

(8) a várható anyagcsere-útvonalakat és a metabolitok molekuláris szerkezetét bemutató ábra.

Tárgyalás és következtetések

72. Ebben a szakaszban a szerzőnek

(1) be kell mutatnia a várható anyagcsere-útvonalakat a vizsgált vegyi anyag metabolizmusa és eloszlása vizsgálatának eredményei alapján,

(2) tárgyalnia kell a vizsgált vegyi anyag eloszlásával és/vagy biotranszformációjával kapcsolatos, fajjal és nemmel összefüggő lehetséges eltéréseket,

(3) táblázatba kell foglalnia és tárgyalnia kell a metabolitok meghatározását és mennyiségét, a kiürülés sebességét, a bioakkumulációs képességet, valamint a kiindulási vegyület és/vagy a metabolitok szövetekben jelen lévő maradványait, továbbá a toxikokinetikai paraméterek lehetséges, dózistól függő változásait, ha vannak,

(4) bele kell foglalnia ebbe a szakaszba a toxicitásvizsgálatok elvégzése során szerzett bármely lényeges toxikokinetikai adatot,

(5) röviden össze kell foglalnia a vizsgálat megállapításaival alátámasztható következtetéseket,

(6) további szakaszokat kell beillesztenie (ha szükséges vagy helyénvaló).

73. Az alátámasztó szakirodalmi információknak, táblázatoknak, ábráknak, függelékeknek stb. további szakaszokban kell helyet kapniuk.

▼M4

ALTERNATÍV EXPOZÍCIÓS ÚTVONALAK

Bőrön át történő expozíció

Bőrön át történő kezelés

74. Ez a szakasz a vizsgált vegyi anyag bőrön keresztüli toxikokinetikájának vizsgálatával kapcsolatos konkrét információkat tartalmaz. A bőrön keresztüli felszívódással kapcsolatban az e melléklet B.44. fejezetében (Bőrön át történő felszívódás: *in vivo* módszer (9)) találhatók információk. Egyéb végpontokkal, például az eloszlással és a metabolizmussal kapcsolatban a jelen B.36. vizsgálati módszer használható. A bőrön át történő kezelés során a vizsgált vegyi anyagot egy vagy több dózisszinten kell bejuttatni. A vizsgált vegyi anyagnak (például a bőrön alkalmazott, vizsgált vegyi anyagot tartalmazó tiszta, hígított vagy kevert anyagnak) meg kell egyeznie azzal az anyaggal, amelynek az emberek vagy más lehetséges célfajok ki lehetnek téve (vagy ennek reális helyettesítőjének kell lennie). A dózisszint(ek)et a jelen vizsgálati módszer 20–26. bekezdésében leírtaknak megfelelően kell megválasztani. A bőrön át bejuttatott dózis megválasztásakor figyelembe vehető tényezők többek között a várható humán kitettség és/vagy olyan dózisok, amelyeknél toxicitást figyeltek meg más dermális toxicitási vizsgálatok során. A bőrön át bejuttatott dózis(oka)t szükség szerint fel kell oldani megfelelő vivőanyagban, és olyan mennyiségben kell felvinni, amely elegendő a dózis bejuttatásához. Röviddel a vizsgálat megkezdése előtt a törzs háti felületén le kell nyírni a kísérleti állatok szőrét. Borotválás is alkalmazható, de azt a vizsgálat megkezdése előtt megközelítőleg 24 órával kell elvégezni. A szőrzet nyírásakor vagy borotválásakor ügyelni kell arra, nehogy lehorzsoljuk a bőrt, mert az megváltoztathatja a bőr áteresztő képességét. A vizsgált vegyi anyag felviteléhez a testfelület körülbelül 10 %-át kell megtisztítani. Erősen toxikus vegyi anyagok esetében a lefedett testfelület 10 %-nál kevesebb is lehet, de a felület lehető legnagyobb részét le kell fedni egy vékony és egységes filmréteggel. Ugyanazt a kezelt felületrészt kell használni az összes bőrvizsgálati csoportnál. A kezelt területeket megfelelő, rögzített borítással kell védeni. Az állatokat külön kell tartani.

75. Bőrlemosási vizsgálatot kell végezni a vizsgált vegyi anyag felvitt dózisa azon mennyiségének megállapítása érdekében, amelyet el lehet távolítani a bőrről a kezelt bőrfelület kímélő szappannal és vízzel történő lemosásával. Ez a vizsgálat a vizsgált vegyi anyag bőrön keresztüli bejuttatása esetén a tömegmérleg meghatározásában is segíthet. E bőrlemosási vizsgálathoz a vizsgált vegyi anyag egyszeri dózisát kell két állatra felvinni. A dózisszintet a jelen vizsgálati módszer 23. bekezdésének megfelelően kell megválasztani (lásd még a bőrrel való érintkezés időtartamát tárgyaló 76. bekezdést). A vizsgált vegyi anyag lemosókból visszanyert mennyiségét meg kell határozni a vizsgált vegyi anyag lemosási eljárással történő eltávolítása hatékonyságának értékelése céljából.

76. Amennyiben a maró hatás ezt nem zárja ki, a felvitt vizsgált vegyi anyagot legalább 6 órán keresztül kell a bőrön hagyni. A védőborítás eltávolításakor a kezelt területet a bőrlemosási vizsgálatnál leírtak szerint le kell mosni az eljárást követően (lásd a 75. bekezdést). A védőborítást és a lemosókat is elemezni kell a visszamaradt vizsgált vegyi anyag kimutatása céljából. A vizsgálat befejezésekor minden állatot humánus módon el kell pusztítani a (2) kiadványnak megfelelően, és a kezelt bőrt el kell távolítani. A kezelt bőr megfelelő részét elemezni kell a visszamaradt vizsgált vegyi anyag (radioaktivitás) meghatározása céljából.

77. Gyógyszerészeti készítmények toxikokinetikai értékeléséhez a vonatkozó szabályozási rendszernek megfelelően eltérő eljárások lehetnek szükségesek.

▼M4

Belélegeztetés

78. A vizsgált vegyi anyag egyszeri (vagy szükség esetén többszöri) koncentrációját kell alkalmazni. A koncentráció(ka)t a jelen vizsgálati módszer 20–26. bekezdésében leírtaknak megfelelően kell megválasztani. A belélegeztetéses kezelést orrtölcséres vagy csak fejen alkalmazott berendezés segítségével kell elvégezni annak érdekében, hogy megelőzhető legyen az alternatív expozíciós útvonalakon keresztüli felszívódás (8). Ha egyéb belélegeztetési expozíciós körülményeket alkalmazunk, a módosítás indokolását dokumentálni kell. A belélegeztetés általi expozíció időtartamát meg kell határozni; az expozíció jellemző időtartama 4–6 óra.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

(2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

(3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73-81.

(4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.

(5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400 – 411.

(6) E melléklet B.45., Bőrön át történő felszívódás: *In vitro* módszer című fejezete.

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) E melléklet B.44., Bőrön át történő felszívódás: *In vivo* módszer című fejezete.

(10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Felszívódás: Vegyi anyagok szövetekbe vagy szöveteken keresztül történő felvételének folyamata(i). A felszívódás a kiindulási vegyületre és annak összes metabolitjára vonatkozik. Nem összetévesztendő a biológiai hozzáférhetőség fogalmával.

Felhalmozódás (bioakkumuláció): A vizsgált vegyi anyag mennyiségének időbeli növekedése a szöveteken belül (általában zsírszövetekben, az ismételt expozíciót követően); ha a vizsgált vegyi anyag nagyobb mennyiségben jut be a testbe, mint amennyi kiürül, a szervezet felhalmozza a vizsgált vegyi anyagot, és a vizsgált vegyi anyag toxikus koncentrációi lehetnek megfigyelhetők.

ADME: Az angol „Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion” (felszívódás, eloszlás, metabolizmus, kiürülés) szavak rövidítése.

AUC (a plazmakoncentráció-idő görbe alatti terület): A vizsgált vegyi anyag plazmában lévő koncentrációját az idő függvényében bemutató ábrán a görbe alatti terület. A testben előre meghatározott időtartamon belül felszívódott vizsgált vegyi anyag teljes mennyiségét jelenti. Lineáris feltételek mellett az AUC (a nullától a végtelenig) a felszívódás sebességétől függetlenül arányos a testben felszívódott vizsgált vegyi anyag teljes mennyiségével.

Autoradiográfia (egésztest-autoradiográfia): Radioaktív vizsgált vegyi anyagok szöveteken belüli lokalizációjának minőségi és/vagy mennyiségi meghatározására szolgáló technika, amely röntgenfilmet, vagy az utóbbi időben digitális foszforos képalkotást alkalmaz a radioizotóppal jelölt molekulák vagy molekulafragmentumok láthatóvá tételére oly módon, hogy rögzíti a vizsgált tárgyon belül kibocsátott sugárzást. A mennyiségi egésztest-autoradiográfia előnyökkel járhat a szerv feltárásával szemben a vizsgált vegyi anyag eloszlásának értékelése, valamint a szövetekben lévő radioaktív anyag általános visszanyerésének és bomlásának vizsgálata szempontjából. A módszer egyik jelentős előnye például, hogy felhasználható egy pigmentált állatokat alkalmazó modellben a vizsgált vegyi anyag a bizonyos molekulák megkötésére képes melaninnal történő lehetséges összekapcsolódásának vizsgálatához. Ugyanakkor bár megfelelő képet nyújthat az egész testről a nagy kapacitású és alacsony affinitású kötési helyek vonatkozásában, a technológia korlátokba ütközhet olyan konkrét célterületek felismerésekor, mint a receptorkötési területek, ahol viszonylag nagy felbontás és magas érzékenység szükséges az észleléshez. Az autoradiográfia használata esetén a bejuttatott vegyület tömegmérlegének meghatározására irányuló kísérleteket különálló csoportként vagy külön vizsgálat során kell elvégezni, nem a szöveti eloszlást vizsgáló kísérlet részeként, ahol az összes kiürülő anyagot (amely magában foglalhatja a kilélegzett levegőt is) és egész testeket homogenizálunk és vizsgálunk folyadékszcintillációs számlálás segítségével.

Epén keresztüli kiürülés: Kiválasztódás az epevezetékeken keresztül.

Bioakkumuláció: Lásd: „Felhalmozódás”.

Biológiai hozzáférhetőség: A bejuttatott dózis azon frakciója, amely eléri a szisztémás keringést, vagy amely elérhetővé válik a fiziológiai hatás helyén. Egy vizsgált vegyi anyag biológiai hozzáférhetősége általában a kiindulási vegyületre vonatkozik, de vonatkozhat annak metabolitjára is. Csak az egyik kémiai formát veszi figyelembe. *Nota bene:* a biológiai hozzáférhetőség és a felszívódás nem ugyanaz. A szájon át történő felszívódás (azaz a bélfalon és a portális keringésben való jelenlét) és a biológiai hozzáférhetőség (azaz a szisztémás vérben és szövetekben való jelenlét) közötti különbség például a kémiai lebomlásból adódhat a bélfali anyagcsere vagy a bél belső részébe történő kiáramló szállítás vagy a májban végbemenő preszisztémás metabolizmus, vagy más tényezők miatt (10). A toxikus összetevő (kiindulási vegyület vagy metabolit) biológiai hozzáférhetősége kritikus paraméter a humán kockázat értékelése (a magasról az alacsony dózisra való extrapoláció, útvonalak közötti extrapoláció) során a belső értékek külső NOAEL vagy BMD (alkalmazott dózis) alapján történő kiszámítása szempontjából. A májra szájon át történő bejuttatás nyomán gyakorolt hatások tekintetében a szájon át történő felszívódás vizsgálata elegendő. A bejutás helyén jelentkező hatások kivételével azonban a biológiai hozzáférhetőség általában az összes hatás szempontjából megbízhatóbb paraméter a kockázatértékelésben történő további használatra, mint a felszívódás.

▼M4

Bioperzisztencia: Lásd: „Perzisztencia”.

Biotranszformáció: Az adott vizsgált vegyi anyag (általában enzimatikus) kémiai átalakulása egy másik vegyi anyaggá a testen belül. A metabolizmus szinonimája.

$\mathbf{C_{max}}$: Vagy a bejuttatást követő maximális (legmagasabb) koncentráció a vérben (plazmában/szérumban), vagy a bejuttatást követő maximális (legnagyobb mértékű) kiürülés (vizeletben vagy székletben).

Kiürülési sebesség: A vizsgált vegyi anyag vérből, plazmából vagy egy bizonyos szövetből egy egységnyi idő alatt történő távozása mértékének mennyiségi meghatározása.

Kompartment: A test, szövet, vagy sejt strukturális vagy biokémiai része (vagy egysége), amely független a többitől.

Detoxikációs útvonalak: A toxikus vegyi anyagok testből történő, metabolikus változás vagy kiürülés útján végbemenő kiürüléséhez vezető lépések sorozata.

Eloszlás: A vizsgált vegyi anyag és származékainak eloszlása a szervezet egészében.

Enzimek/izoenzimek: Kémiai reakciókat katalizáló fehérjék. Az izoenzimek hasonló kémiai reakciókat katalizáló, de aminosav-szekvenciájukban különböző enzimek.

Enzimatikus paraméterek: K_m: Michaelis-állandó, valamint V_{max}: maximális sebesség.

Kiürülés: Azon folyamat(ok), amely(ek) révén a bejuttatott vizsgált vegyi anyag és/vagy annak metabolitjai távoznak a szervezetből.

Exogén: A szervezeten vagy rendszeren kívülről bejuttatott vagy ott termelt.

Extrapoláció: Egy vagy több ismeretlen értékre való következtetés ismert vagy megfigyelt adatok alapján.

Felezési idő ($t_{1/2}$): Egy adott kompartmentben lévő vizsgált vegyi anyag koncentrációjának felére való csökkenéséhez szükséges idő. Általában a plazmabeli koncentrációra vagy a vizsgált vegyi anyag egész testben jelen lévő mennyiségére vonatkozik.

Indukció/enzimindukció: Környezeti inger vagy indukáló molekula hatására lezajló enzimszintézis.

Linearitás/lineáris kinetika: Egy folyamat kinetikai szempontból akkor lineáris, ha a kompartmentek közötti átvitel sebessége arányos a jelen lévő mennyiségekkel vagy koncentrációkkal, azaz elsőrendű. Következésképpen a kiürülési és eloszlási mennyiségek, valamint a felezési idők is állandók. Az elért koncentrációk arányosak az adagolás mértékével (expozícióval), és a felhalmozódás is könnyebben előre jelezhető. A linearitás/nemlinearitás a vonatkozó paraméterek, például a különböző dózisok utáni vagy egyszeri, illetve ismételt expozíció utáni AUC összehasonlításával vizsgálható. A dózistól való függőség hiánya a vegyület metabolizmusában részt vevő enzimek telítődésére, az AUC ismételt expozíciót követő, egyszeri expozícióhoz képesti növekedése pedig a metabolizmus akadályozására utalhat, míg az AUC csökkenése a metabolizmus indukcióját jelezheti (lásd még: (11)).

Tömegmérleg: A vizsgált vegyi anyag szervezetbe bejutott és onnan távozó mennyiségének mérlege.

Anyagmérleg: Lásd: „Tömegmérleg”.

Toxicitás mechanizmusa (módja)/hatásmechanizmus (-mód): A hatásmechanizmus azokat a meghatározott biokémiai interakciókat jelenti, amelyek révén a vizsgált vegyi anyag kifejti hatását. A hatás módja a vizsgált vegyi anyag toxicitásához vezető általánosabb folyamatokat jelenti.

▼M4

Metabolizmus: A biotranszformáció szinonimája.

Metabolitok: A metabolizmus vagy a metabolikus folyamatok termékei.

Szájon át történő felszívódás: A vizsgált vegyi anyag dózisának a bejuttatás helyén (például az emésztőrendszerben) felszívódott százaléka. Ez a kritikus paraméter felhasználható a bejuttatott vizsgált vegyi anyag azon frakciójának megismeréséhez amely eléri a portális vénát, majd a májat.

Megoszlási hányados: Más néven megoszlási együttható; egy vegyi anyag két oldószerben fennálló különböző oldhatóságát fejezi ki.

Vérben (plazmában/szérumban) megfigyelhető legmagasabb szintek: A bejuttatást követő maximális (legmagasabb) koncentráció a vérben (plazmában/szérumban) (lásd még: „C_{max}”).

Perzisztencia (bioperzisztencia): Az adott vegyi anyag hosszú távú jelenléte (egy biológiai rendszerben) a lebomlásnak/eltávolításnak való ellenállás következtében.

Read-across módszer: Egy vagy több vegyi anyag végponti információinak felhasználása a célvegyszer végpontjának előrejelzéséhez.

Receptoros mikroszkopikus autoradiográfia (vagy receptoros mikroautoradiográfia): Ez a technológia a meghatározott szöveti helyekkel vagy sejtpopulációkkal történő xenobiotikus interakció vizsgálatára használható, például a receptorkötéssel vagy meghatározott hatásmóddal foglalkozó vizsgálatok során, amelyek nagy felbontást és magas fokú érzékenységet igényelhetnek, és amelyek más technológiákkal, például egésztest-autoradiográfiával nem megvalósíthatók.

Bejuttatási útvonal (szájon át történő, intravénás, bőrön át történő, belélegeztetéssel történő stb.): A vegyi anyagok testbe történő bejuttatásának módját jelenti (például szájon át szondatáplálással, szájon át táplálékkal, bőrön át, belélegeztetéssel, intravénásan stb.).

Telítettség: Az az állapot, amikor egy vagy több kinetikai folyamat (például felszívódás, metabolizmus vagy kiürülés) eléri a maximumát (azaz „telítetté” válik).

Érzékenység: Egy módszer vagy eszköz azon képessége, hogy meg tudja különböztetni az adott változó különböző szintjeire utaló mérési eredményeket.

Állandósult vér- (plazma-) szintek: Egy nyílt rendszer nem egyensúlyi állapota, amelyben a rendszerre ható összes hatást pontosan kiegyenlítik az ellentétes hatások, oly módon, hogy a rendszer összes összetevőjének koncentrációja állandó annak ellenére, hogy a rendszeren anyag áramlik keresztül.

Rendszermodell (élettani alapú toxikokinetikai, farmakokinetikai alapú, élettani alapú farmakokinetikai, biológiai alapú stb.): Egy rendszer viselkedését a matematika nyelvén leíró absztrakt modell.

Célszövet: Az a szövet, amelyben egy toxikus anyag valamely elsődleges negatív hatása megmutatkozik.

▼**M4**

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely vegyi anyag vagy keverék.

Szöveti eloszlás: A vizsgált vegyi anyagnak a test egyik helyéről a másikra történő, visszafordítható mozgása. A szöveti megoszlás a szerv feltárása, homogenizáció, oxidáció és folyadékszcintillációs számlálás, vagy minőségi és/vagy mennyiségi egésztest-autoradiográfia segítségével vizsgálható. Az előbbi hasznos az ugyanazon állatok szöveteiből és maradványaiból visszanyert vizsgált vegyi anyag koncentrációjának és százalékos arányának meghatározásához, de felbontása nem feltétlenül megfelelő az összes szövet vizsgálatához, és lehet, hogy általánosságban nem képes elérni a visszanyert vegyi anyag ideális mennyiségét (< 90 %). Az utóbbi meghatározását lásd fent.

$\mathbf{T_{max}}$: A C_{max} eléréséhez szükséges idő.

Toxikokinetika (farmakokinetika): Vegyi anyagok időbeli felszívódásának, eloszlásának, metabolizmusának és kiürülésének vizsgálata.

Modellek validációja: Egy modell rendelkezésre álló toxikokinetikai adatok konzisztens leírására való megfelelősége értékelésének folyamata. A modelleket azok előrejelzéseinek a kísérleti értékekkel történő statisztikai és vizuális összehasonlításával lehet értékelni egy közös, független változó (például az idő) alapján. Az értékelés mértékét indokolni kell a modell tervezett használata vonatkozásában.

▼B

B.37. SZERVES FOSZFORVEGYÜLETEKKEL KIVÁLTOTT AKUT KÉSLELTETETT NEUROTOXICITÁS

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

Az egyes anyagok toxikus hatásainak felbecslése és kiértékelése során fontos azt figyelembe venni, hogy az anyagok egyes osztályai bizonyos típusú neurotoxicitást okozhatnak, amelyet esetleg nem lehet bebizonyítani más típusú toxicitásvizsgálatokkal, de szükséges a vizsgálata. Egyes foszfororganikus vegyületek a korábbi megfigyelések szerint késleltetett neurotoxikus hatásokat okoznak, ezek azok az anyagok, amelyeknek az e (alábbiakban ismertett) módszer szerinti vizsgálata szóba jöhet.

In vitro szűrővizsgálatokat lehet alkalmazni azoknak az anyagoknak a meghatározása céljából, amelyek késleltetett polyneuropathiát okozhatnak; mindazonáltal az *in vitro* vizsgálatok negatív eredménye nem biztosíték arra, hogy az anyag nem idegméreg.

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

A foszfororganikus vegyületekhez tartoznak azok a telítetlen foszfororganikus észterek, a tioészterek vagy a szerves foszforsavak, a foszfonsavak és a foszforamid-savak anhidridjei, illetve a rokon foszfortiosav, foszfontiosav vagy foszfortioamid-sav, továbbá egyéb anyagok, amelyek ebbe a vegyületosztályba tartoznak, és olykor megfigyelhető késleltetett neurotoxicitást okozhatnak.

Késleltetett neurotoxicitás az a tünetcsoport, amely a hosszan késleltetett végtagmozgási zavarokkal (ataxia), a gerincvelő és a környéki (perifériás) idegek távoli kötődéseivel és az idegszövetben lévő neuropathiás cél-észterázok (NTE) gátlásával vagy öregedésével kapcsolatos.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Egy referenciaanyagot meg lehet vizsgálni egy pozitív kontrollcsoport segítségével azzal a céllal, hogy bemutassák, hogy laboratóriumi vizsgálati körülmények között a kísérleti fajok reakciója nem változik lényegesen.

Példa egy széleskörűen alkalmazott idegméregre a tri-o-tolil-foszfát (CAS 78-30-8, EINECS 210-103-5, CAS-elnevezése: Foszforsav-trisz(4-metilfenil)-észter, más néven Trikrezil-foszfát.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot egy dózisban, szájon keresztül adják be házityúkoknak, amelyeket szükség esetén megóvtak az akut kolinerg hatásoktól. Az állatokat 21 napon keresztül figyelik meg viselkedési rendellenességek, ataxia és paralízis szempontjából. A biokémiai paramétereket, különösen a neuropathiás cél-észterázok (NTE) gátlását minden csoportból véletlenszerűen kiválasztott tyúkokon mérik, általában az adagolás után 24–48 órával. Az adagolás után 21 nappal az életben maradt tyúkokat elpusztítják, és egyes idegszövetek kórszövettani vizsgálatát elvégzik.

▼B

1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.5.1. **Előkészületek**

Egészséges, fiatal, felnőtt tyúkokkal kísérleteznek, amelyek mentesek a zavaró vírusos betegségektől és gyógykezeléstől, továbbá nincs járászavaruk; az állatokat véletlenszerűen kezelt és kontrollcsoportba osztják és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig hagyják őket a laboratóriumi körülményekhez alkalmazkodni.

Olyan ketrecet vagy karámot használnak, amely elég nagy ahhoz, hogy lehetővé tegye a tyúkok szabad mozgását és a járásképkönnyű megfigyelését.

A vizsgált anyagot orálisan adják be, gyomorszonda segítségével, vagy zselatin kapszulák alkalmazásával vagy egyéb hasonló eljárással. A folyadékokat hígítás nélkül vagy megfelelő vivőanyagban, pl. kukoricaolajban feloldva adják be; a szilárd anyagokat lehetőség szerint feloldják, mivel a zselatin kapszulába helyezett nagy mennyiségű szilárd anyag esetleg nem szívódik fel teljesen. Amennyiben nem víz a vivőanyag, akkor a vivőanyag toxikus tulajdonságainak ismertnek kell lenniük, eltérő esetben e tulajdonságokat a vizsgálat megkezdése előtt meghatározzák.

1.5.2. **Vizsgálati körülmények**

1.5.2.1. A kísérlethez felhasznált állatok

A fiatal felnőtt, 8–12 hónapos házi tojótyúk (*Gallus gallus domesticus*) használata ajánlott. A szokásos méretű fajtákat használják, olyan tyúkokat, amelyeket szabad mozgást biztosító körülmények között tenyésztettek.

1.5.2.2. Az állatok száma és neme

A kezelt csoport mellett mind vivőanyagos kontrollcsoportot, mind pozitív kontrollcsoportot vizsgálnak. A vivőanyagos kontrollcsoportban lévő állatokat a vizsgált anyag beadásától eltekintve a kezelt csoportba beosztottakkal azonos bánásmódban részesítik.

Az egyes csoportokban lévő állatok számát oly módon határozzák meg, hogy legalább hat madarat el lehessen pusztítani a biokémiai paraméterek meghatározásaihoz (hármat-hármat a két külön megfigyelési időpontban); továbbá hat madár túlélje a 21 napos megfigyelési időszakot, mert ezeken patológiai vizsgálatokat végeznek majd.

A pozitív kontrollcsoportot lehet egyidejűleg vizsgálni, vagy ez lehet egy korábbi, már vizsgált kontrollcsoport is. Ez a csoport legalább hat tyúkból áll, amelyeket egy ismert, késleltetett hatású idegméreggel kezelnek. Az állatok közül hármat biokémiai, hármat patológiai vizsgálatok céljára szánnak. A korábbi adatok rendszeres aktualizálása javasolt. Új pozitív kontrolladatokat vesznek fel, ha a vizsgálat lefolytatásának valamilyen fontos eleme (pl. származás, táplálék, tartási körülmények) megváltozik a vizsgálatot végző laboratóriumban.

▼B

1.5.2.3. Adagolási szintek

Az előzetes tanulmány során megfelelő számú állatnak és adagolási csoportnak a fő kísérletben alkalmazott dózist adagolják. Csekély számú kísérleti állat elhullása általában szükséges ebben az előzetes tanulmányban, a fő vizsgálat megfelelő dózisszintjeinek kiválasztásához. Az akut kolinerg hatások miatt bekövetkező elhullások megakadályozása érdekében atropint vagy egyéb olyan védő hatóanyagot alkalmazhatnak, amely közismerten nem befolyásolja a késleltetett neurotoxikus hatásokat. Többféle vizsgálati módszer alkalmazható a vizsgált anyag legnagyobb nem halálos dózisának meghatározásához (lásd B.l.A. módszer). A tyúkokra vonatkozó korábbi adatok vagy egyéb toxikológiai adatok is hasznosnak bizonyulhatnak a dózis kiválasztása során.

A fő vizsgálat során alkalmazott vizsgált anyag dózisa az előzetes dózisbehatároló vizsgálat eredményeinek figyelembevételével meghatározott lehető legmagasabb legyen, 2 000 mg/kg testsúly felső határ mellett. Esetleg előforduló időközbeni elhullás nem gátolhatja meg a szükséges mennyiségű állat túlélését a biokémiai (hat) és a szövettani (hat) vizsgálatokhoz a 21. napon. Az akut kolinerg hatások miatt bekövetkező elhullást atropinnal vagy egyéb védő hatóanyag alkalmazásával kerülik el, amely bizonyított módon nem gyakorol befolyást a késleltetett neurotoxikus hatásokra.

1.5.2.4. Határérték-vizsgálat

Ha a kísérlet során a legalább 2 000 mg/kg testsúly/nap adagolási szint, illetve az e vizsgálat lefolytatására előírt eljárás betartása mellett a vizsgált anyag nem okoz észlelhető toxikus hatásokat, és ha a szerkezet tekintetében rokon anyagokra vonatkozó adatok alapján nem is várható a toxicitás bekövetkezése, akkor a teljes, három adagolási szintet átfogó tanulmány elvégzése szükségtelennek tekinthető. A határérték-vizsgálat alkalmazható, kivéve ha emberi expozíció ennél nagyobb adagolási szint használatát indokolja.

1.5.3. **Megfigyelési időszak**

A megfigyelési időszak 21 nap.

1.5.4. **A kísérlet végrehajtása**

Az akut kolinerg hatások miatt bekövetkező elhullás megakadályozása érdekében alkalmazott védő anyag beadása után a vizsgált anyagot egyszeri dózisban adják be.

Megfigyelések

A megfigyelés mindjárt közvetlenül az expozíció után megkezdődik. Az első 2 napon minden tyúkot többször gondosan megfigyelnek, majd ezt követően 21 napon keresztül vagy a tervezett elpusztításig, legalább naponta egyszer. A toxicitás minden tünetét gondosan feljegyzik, beleértve a viselkedési rendellenesség kialakulásának időpontját, típusát, súlyosságát és tartamát. A végtagok mozgási zavarát (ataxia) skálán mérik, amely legalább négy szintet tartalmaz, továbbá a bénulást (paralízis) is feljegyzik. Hetente legalább kétszer kiveszik a ketrecből azokat a tyúkokat, amelyeket patológiai vizsgálatoknak szándékoznak alávetni, és egy meghatározott időre fokozott motoros tevékenységet váltanak ki (pl. létramászás), hogy már a legkisebb jelentkező toxikus hatások megfigyelhetőségét megkönnyítsék. A haldokló állatokat és súlyosan szenvedő, vagy fájdalommal küszködő állatokat az állatvédelmi előírásoknak megfelelően elpusztítják, majd felboncolják.

▼B

Testsúly

Minden tyúkot lemérnek közvetlenül a vizsgált anyag beadása előtt, majd ezután legalább hetente egyszer.

Biokémiai vizsgálatok

Minden kezelt és vivőanyag kontrollcsoportból hat tyúkot, a pozitív kontrollcsoportból hármat (ha egyidejűleg ezt a csoportot is vizsgálják) véletlenszerűen kiválasztanak és a vizsgált anyag beadása után pár nappal elpusztítanak, azért hogy az agyat és a lumbális gerincvelőt preparálják, és abban a neuropathiás cél-észteráz (NTE) gátló aktivitást megmérik. Ezen túlmenően hasznos lehet az ülőideg kikészítése és abban a neuropathiás cél-észteráz (NTE) gátló aktivitásának megmérése. Általában három madarat pusztítanak el mind a kezelt csoportokban, mind a negatív kontrollcsoportban az utolsó dózis után 24 órával, és másik hármat 48 órával később, a pozitív kontrollcsoportból származó három kísérleti állatot 24 órával később pusztítják el. Ha az intoxikáció klinikai tüneteinek megfigyeléséből (pl. a kolinerg tünetek időbeli jelentkezésének megfigyeléséből) arra lehet következtetni, hogy a toxikus hatóanyag kifejezetten lassan hat, akkor ajánlatos mind a három állattól két alakalommal 24–72 órával a vizsgált anyag adagolását követően szövetmimtákat venni.

Acetil-kolin észteráz (AChE) elemzését is el lehet végezni ezeken a mintákon, ha az célszerűnek tűnik. Figyelembe kell azonban venni az AChE spontán újraaktiválódását, amely *in vivo* előfordulhat, és így az anyag AChE gátló hatásának alulértékelését okozhatja.

Autopszia

Minden (a tervezett módon és a haldoklás miatt állatvédelmi okokból elpusztított) állat agyát és gerincvelőjét boncolásnak vetik alá.

Kórszövettani vizsgálat

A vizsgálati időszakot túlélő és azon állatok idegszöveteit, amelyeket nem biokémiai kísérleteknek vetnek alá, mikroszkóppal megvizsgálják. A szöveteket perfúziós módszerrel természetes helyzetben (*in situ*) tartósítják. A metszetek tartalmazzák a kisagyat (középső hosszanti szinten), a nyúltagyat, a gerincvelőt és a környéki (perifériás) idegeket. Gerincvelő-metszeteket a felső nyaki, a középső mellkasi és az ágyékkeresztcsonti szakaszból veszik. A környéki idegi metszeteket a sípcsonti ideg és gyomorizomhoz tartó elágazásaiból és az ülőidegből veszik. A metszeteket megfestik a megfelelő mielinre és axonra érzékeny festékkel. Először elvégzik a mikroszkópos vizsgálatot minden állat tartósított szövetein a kontroll- és a legnagyobb adagolású csoportnál. Ha bizonyítható a hatás a legnagyobb adagolású csoportnál, akkor elvégzik a mikroszkópos vizsgálatot a középső és az alacsony adagolású csoport állatainak szövetein is.

2. **ADATOK**

Az ebben a módszerben a kiválasztott végpontokon kapott negatív eredmények (biokémia, kórszövettan és viselkedési megfigyelések) általános esetben nem igényelnek további vizsgálatot a késleltetett neurotoxicitás vonatkozásában. Bizonytalan vagy nem meggyőző eredmények esetén szükség lehet további vizsgálatokra.

Minden egyes állattal kapcsolatban rögzítik az adatokat. Ezenfelül az összes adatot táblázat formájában összegzik. Ebből a kísérleti állatok minden csoportja tekintetében kiderül: a kísérlethez felhasznált álltok száma a vizsgálat elején, a sérült állatok száma, viselkedési vagy biokémiai hatások, a sérülések, illetve hatások típusa, súlyossága és az egyes sérüléseket vagy hatásokat mutató állatok százalékos eloszlása, típus és súlyosság szerint csoportosítva.

▼B

E vizsgálat eredményeit az egyes kezelt és kontrollcsoportok tekintetében viselkedési, biokémiai és kórszövettani hatások gyakorisága, súlyossága, korrelációja, valamint bármely más megfigyelt hatás alapján értékelik ki.

A számszerű eredményeket megfelelő, általánosan elfogadott statisztikai módszerekkel értékelik ki. Az alkalmazott statisztikai módszereket a vizsgálat tervezése során választják ki.

3. **JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés – amennyiben lehetséges – tartalmazza a következő információkat:

3.1. Kísérleti állatok

— a felhasznált állatok faja,

— az állatok száma és életkora,

— az állatok eredete, tartási körülmények stb.,

— az egyes állatok súlya a vizsgálat kezdetekor.

3.2. Vizsgálati körülmények

— a vizsgált anyag előkészítésére, stabilitására és homogenitására vonatkozó részletek,

— a vivőanyag kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált anyag beadására vonatkozó adatok,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok,

— a dózis kiválasztásának indoka,

— a beadott dózisok jellemzése, beleértve a vivőanyagot, térfogatot és a beadott anyag fizikai formáját,

— bármely beadott védőanyag nevét, illetve beadására vonatkozó adatokat.

3.3. Eredmények

— testsúlyadatok,

— a toxikus reakciókra vonatkozó adatok csoportonként, beleértve az elhullást,

— a megfigyelt klinikai tünetek természete, súlyossága és tartama (reverzibilisek vagy nem),

— a biokémiai módszerek részletes leírása és eredményei,

— boncolási eredmények,

— az összes kórszövettani lelet részletes leírása,

— az eredmények statisztikai feldolgozása, ha alkalmazható.

Az eredmények tárgyalása

Összefoglaló megállapítások.

4. **HIVATKOZÁSOK**

Ez a módszer megfelel az OECD TG 418-nak.

▼B

B.38. SZERVES FOSZFORVEGYÜLETEKKEL KIVÁLTOTT KÉSLELTETETT NEUROTOXOCITÁS-VIZSGÁLAT, 28 NAPOS ISMÉTELT ADAGOLÁS ESETÉN

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

Az egyes anyagok toxikus hatásainak felbecslése és kiértékelése során fontos azt figyelembe venni, hogy az anyagok egyes osztályai bizonyos típusú neurotoxicitást okozhatnak, amelyet esetleg nem lehet bebizonyítani más típusú toxicitásvizsgálatokkal, de szükséges a vizsgálata. Egyes foszfororganikus vegyületek a korábbi megfigyelések szerint késleltetett neurotoxikus hatásokat okoznak, ezek azok az anyagok, amelyeknek az e (alábbiakban ismerteti) módszer szerinti vizsgálata szóba jöhet.

In vitro szűrővizsgálatokat lehet alkalmazni azoknak az anyagoknak a meghatározása céljából, amelyek késleltetett polyneuropathiát okozhatnak; mindazonáltal az *in vitro* vizsgálatok negatív eredménye nem biztosíték arra, hogy az anyag nem idegméreg.

Ez a 28 napos késleltetett neurotoxicitást vizsgáló tanulmány ismereteket szolgáltat azokról a lehetséges egészségügyi veszélyekről, amelyek adott időn keresztül ismétlődő expozíció során fennállhatnak. Ezen vizsgálat eredményeiből következtetéseket lehet levonni a dózis-hatás viszonyra, valamint lehetővé teszi annak a küszöbdózisnak a meghatározását, amelynél nem észlelhető kedvezőtlen hatás (NOAEL), és amely hasznos lehet az emberi expozíció biztonsági kritériumainak meghatározása során.

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

A foszfororganikus vegyületekhez tartoznak azok a telítetlen foszfororganikus észterek, a tioészterek vagy a szerves foszforsavak, a foszfonsavak és a foszforamid-savak anhidridjei, illetve a rokon foszfortiosav, foszfontiosav vagy foszfortioamid-sav, továbbá egyéb anyagok, amelyek ebbe a vegyületosztályba tartoznak, és olykor megfigyelhető késleltetett neurotoxicitást okozhatnak.

Késleltetett idegmérgezés az a tünetcsoport, amely a hosszan késleltetett végtagmozgási zavarokkal (ataxia), a gerincvelő és a környéki (perifériás) idegek távoli kötődéseivel és az idegszövetben lévő neuropathiás cél-észterázok (NTE) gátlásával vagy öregedésével kapcsolatos.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot naponta egyszer, szájon át adják be házityúkoknak 28 napon keresztül. Az állatokat az utolsó dózis beadását követően 14 napon keresztül figyelik, legalább naponta egyszer a viselkedési rendellenességek, ataxia és paralízis szempontjából. A biokémiai paramétereket, különösen a neuropathiás cél-észterázok (NTE) gátlását minden csoportból véletlenszerűen kiválasztott tyúkokon mérik, általában az adagolás után 24–48 órával. Az adagolás után két héttel az életben maradt tyúkokat elpusztítják, és az egyes idegszövetek kórszövettani vizsgálatát elvégzik.

▼B

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Előkészületek**

Egészséges, fiatal, felnőtt tyúkokkal kísérleteznek, amelyek mentesek a zavaró vírusos betegségektől és gyógykezeléstől, továbbá nincs járászavaruk; az állatokat véletlenszerűen kezelt és kontrollcsoportba osztják, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig hagyják őket a laboratóriumi körülményekhez alkalmazkodni.

Olyan ketrecet vagy karámot használnak, amely elég nagy ahhoz, hogy lehetővé tegye a tyúkok szabad mozgását és a járáskép könnyű megfigyelését.

A vizsgált anyagot heti hét napon át orálisan adják be, gyomorszonda segítségével, vagy zselatin kapszulák alkalmazásával. A folyadékokat hígítás nélkül vagy megfelelő vivőanyagban, pl. kukoricaolajban feloldva adják be; a szilárd anyagokat lehetőség szerint feloldják, mivel a zselatin kapszulába helyezett nagy mennyiségű szilárd anyag esetleg nem szívódik fel teljesen. Amennyiben nem víz a vivőanyag, akkor a vivőanyag toxikus tulajdonságainak ismertnek kell lenniük, eltérő esetben e tulajdonságokat a vizsgálat megkezdése előtt meghatározzák.

1.4.2. **Vizsgálati körülmények**

1.4.2.1. *Kísérlethez felhasznált állatok*

A fiatal felnőtt, 8–12 hónapos házi tojótyúk (*Gallus gallus domesticus*) használata ajánlott. A szokásos méretű fajtákat használják, olyan tyúkokat, amelyeket szabad mozgást biztosító körülmények között tenyésztettek.

1.4.2.2. *Az állatok száma és neme*

Általában a három kezelt csoport mellett vivőanyagos kontrollcsoportot is vizsgálnak. A vivőanyagos kontrollcsoportban lévő állatokat a vizsgált anyag beadásától eltekintve a kezelt csoportba beosztottakkal azonos bánásmódban részesítik.

Az egyes csoportokban lévő állatok számát oly módon határozzák meg, hogy legalább hat madarat el lehessen pusztítani a biokémiai paraméterek meghatározásaihoz (hármat-hármat a két külön megfigyelési időpontban); továbbá hat madár túlélje 14 nappal az utolsó beadott adagot, mert ezeken patológiai vizsgálatokat végeznek majd.

1.4.2.3. *Adagolási szintek*

Az adagolási szintek kiválasztásánál figyelembe veszik a késleltetett neurotoxicitás (akut) megállapítására elvégzett vizsgálat eredményeit és a vizsgált anyag toxicitásra, illetve kinetikájára vonatkozóan rendelkezésre álló adatokat. A legmagasabb dózist úgy választják ki, hogy az toxikus tüneteket keltsen, de ne okozzon halált, vagy súlyos szenvedést a kísérleti állatoknak. Ezután az adagokat fokozatosan csökkentik, azzal a céllal, hogy bemutassák az adagolási szinttől függő hatásokat és a nem észlelhető kedvezőtlen hatás szintet.

▼B

1.4.2.4. *Határérték-vizsgálat*

Ha a kísérlet során a legalább 1 000 mg/kg testsúly/nap adagolási szint, illetve az e vizsgálat lefolytatására előírt eljárás betartása mellett a vizsgált anyag nem okoz észlelhető toxikus hatásokat, és ha a szerkezet tekintetében rokon anyagokra vonatkozó adatok alapján nem is várható a toxicitás bekövetkezése, akkor a teljes, három adagolási szintet átfogó tanulmány elvégzése szükségtelennek tekinthető. A határérték-vizsgálat alkalmazható, kivéve ha emberi expozíció ennél nagyobb adagolási szint használatát indokolja.

1.4.2.5. *Megfigyelési időszak*

Minden állatot legalább naponta megfigyelnek az expozíció időszaka alatt, majd azt követően 14 napon keresztül, kivéve ha tervezett boncolást hajtanak végre.

1.4.3. **A kísérlet végrehajtása**

Az állatoknak 28 napon keresztül hetente hétszer adják be a vizsgálati anyagot.

Megfigyelések

A megfigyelés mindjárt közvetlenül a kezelés kezdetétől tart. A kezelés mind a 28 napján majd az utolsó adag beadását követően 14 napon át vagy a tervezett elpusztításig legalább naponta egyszer megfigyelnek minden állatot. A toxicitás minden tünetét gondosan feljegyzik, beleértve kialakulásuk időpontját, a típust, súlyosságot és tartamot. A megfigyelések kiterjednek viselkedési rendellenességekre is. A végtagok mozgási zavarát (ataxia) skálán mérik, amely legalább négy szintet tartalmaz, továbbá a bénulást (paralízis) is feljegyzik. Hetente legalább kétszer kiveszik a ketrecből az állatokat, és egy meghatározott időre fokozott motoros tevékenységet váltanak ki (pl. létramászás), hogy már a legkisebb jelentkező toxikus hatások megfigyelhetőségét megkönnyítsék. A haldokló állatokat és súlyosan szenvedő vagy fájdalommal küszködő állatokat az állatvédelmi előírásoknak megfelelően elpusztítják, majd felboncolják.

Testsúly

Minden tyúkot lemérnek közvetlenül a vizsgált anyag beadása előtt, majd ezután legalább hetente egyszer.

Biokémiai vizsgálatok

Minden kezelt és vivőanyag kontrollcsoportból hat tyúkot kiválasztanak véletlenszerűen, és a vizsgált anyag utolsó beadása után pár nappal elpusztítanak, azért hogy az agyat és a lumbális gerincvelőt preparálják, és abban a neuropathiás cél-észteráz (NTE) gátló aktivitást megmérjék. Ezen túlmenően hasznos lehet az ülőideg kikészítése és abban a neuropathiás cél-észteráz (NTE) gátló aktivitásának megmérése. Általában három madarat pusztítanak el mind a kezelt csoportokban, mind a kontrollcsoportban az utolsó dózis után 24 órával és másik hármat 48 órával később. Ha az akut vizsgálatból vagy más kísérletekből (pl. toxikokinetikai) arra lehet következtetni, hogy az utolsó adag beadását követően a fentiektől eltérő időpontban fognak mutatkozni a pusztulás jelei, akkor a kísérlet menetét ennek megfelelően megváltoztatják, és meg is indokolják a döntést.

Az acetil-kolin-észteráz (AChE) elemzését is el lehet végezni a mintákon, ha az célszerűnek látszik. Figyelembe kell azonban venni az AChE spontán újraaktiválódását, amely *in vivo* előfordulhat, és így az anyag AChE gátló hatásának alulértékelését okozhatja.

▼B

Autopszia

Minden (a tervezett módon és a haldoklás miatt állatvédelmi okokból elpusztított) állat agyát és gerincvelőjét boncolásnak vetik alá.

Kórszövettani vizsgálatok

A vizsgálati időszakot túlélő és azon állatok idegszöveteit, amelyeket nem biokémiai kísérleteknek vetnek alá, mikroszkóppal megvizsgálják. A szöveteket perfúziós módszerrel természetes helyzetben (*in situ*) tartósítják. A metszetek tartalmazzák a kisagyat (középső hosszanti szinten), a nyúltagyat, a gerincvelőt és a környéki (perifériás) idegeket. Gerincvelő-metszeteket a felső nyaki, a középső mellkasi és az ágyékkeresztcsonti szakaszból veszik. A környéki idegi metszeteket a sípcsonti ideg és gyomorizomhoz tartó elágazásaiból és az ülőidegből veszik. A metszeteket megfestik a megfelelő mielinre és axonra érzékeny festékkel. Először elvégzik a mikroszkópos vizsgálatot minden állat tartósított szövetein a kontroll- és a legnagyobb adagolású csoportnál. Ha bizonyítható a hatás a legnagyobb adagolású csoportnál, akkor elvégzik a mikroszkópos vizsgálatot a középső és az alacsony adagolású csoport állatainak szövetein is.

2. **ADATOK**

Az ebben a módszerben a kiválasztott végpontokon kapott negatív eredmények (biokémia, kórszövettan és viselkedési megfigyelések) általános esetben nem igényelnek további vizsgálatot a késleltetett neurotoxicitás vonatkozásában. Bizonytalan vagy nem meggyőző eredmények esetén szükség lehet további vizsgálatokra.

Minden egyes állattal kapcsolatban rögzítik az adatokat. Ezenfelül az összes adatot táblázat formájában összegzik. Ebből a kísérleti állatok minden csoportja tekintetében kiderül: a kísérlethez felhasznált álltok száma a vizsgálat elején, a sérült állatok száma, viselkedési vagy biokémiai hatások, a sérülések, illetve hatások típusa, súlyossága és az egyes sérüléseket vagy hatásokat mutató állatok százalékos eloszlása, típus és súlyosság szerint csoportosítva.

E vizsgálat eredményeit az egyes kezelt és kontrollcsoportok tekintetében viselkedési, biokémiai és kórszövettani hatások gyakorisága, súlyossága, korrelációja, valamint bármely más megfigyelt hatás alapján értékelik ki.

A számszerű eredményeket megfelelő, általánosan elfogadott statisztikai módszerekkel értékelik ki. Az alkalmazott statisztikai módszereket a vizsgálat tervezése során választják ki.

3. **JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés – amennyiben lehetséges – a következő információkat tartalmazza:

3.1. Kísérleti állatok

— a felhasznált állatok faja,

— az állatok száma és életkora,

— az állatok eredete, tartási körülmények stb.,

— az egyes állatok súlya a vizsgálat kezdetekor.

▼B

3.2. Vizsgálati körülmények

— a vizsgált anyag előkészítésére, stabilitására és homogenitására vonatkozó részletek,

— a vivőanyag kiválasztásának indoklása,

— a vizsgálati anyag beadására vonatkozó adatok,

— táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok,

— a dózis kiválasztásának indoka,

— a beadott dózisok jellemzése, beleértve a vivőanyagot, térfogatot és a beadott anyag fizikai formáját,

— a biokémiai paraméterek meghatározásra választott időpontok indoklása, ha az 24 és 48 órától eltér.

3.3. Eredmények

— testsúlyadatok,

— a toxikus reakciókra vonatkozó adatok csoportonként, beleértve az elhullást,

— nem észlelhető kedvezőtlen hatás, NOAEL,

— a megfigyelt klinikai tünetek természete, súlyossága és tartama (reverzibilisek, vagy nem),

— a biokémiai módszerek részletes leírása és eredményei,

— boncolási eredmények,

— az összes kórszövettani lelet részletes leírása,

— az eredmények statisztikai feldolgozása, ha alkalmazható.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

4. **HIVATKOZÁSOK**

Ez a módszer megfelel az OECD TG 419-nek.

▼B

B.39. **NEM ÜTEMEZETT DNS-SZINTÉZIS (UDS) *IN VIVO* VIZSGÁLAT EMLŐS MÁJSEJTEKKEL**

1. **MÓDSZER**

E módszer megfelel az OECD TG 486-nak, emlősmáj-sejtekkel végrehajtott nem ütemezett DNS-szintézis (UDS) *in vivo* vizsgálat (1997).

1.1. BEVEZETÉS

Az emlősmáj-sejtekkel végzett nem ütemezett DNS-szintézis (UDS) *in vivo* vizsgálat célja azon anyagok meghatározása, amelyek DNS-reparációt váltanak ki a kezelt állatok májsejtjeiben (1) (2) (3) (4).

Ez az *in vivo* vizsgálat lehetővé teszi a kémiai anyagoknak a májban okozott genotoxikus hatásainak vizsgálatát. A vizsgált végpont következtetni enged a májsejtekben a DNS-károsodásra és az ezt követő reparációra. A máj rendszerint az abszorbeált vegyületek metabolizmusának fő helyszíne. Ebből következően megfelelő hely DNS-károsodás *in vivo* vizsgálatára.

Ha bizonyos jelek utalnak arra, hogy a vizsgált anyag nem éri el a célszövetet, akkor e vizsgálat nem megfelelő.

A nem ütemezett DNS-szintézis (UDS) végpontját a megjelölt nukleozidok felvételének meghatározásával lehet mérni azon sejtekben, amelyek nem mennek keresztül az ütemezett (S fázisú) DNS-szintézisen. A legelterjedtebben használt módszer a tríciummal megjelölt timidin (^{3}H-TdR) felvételének meghatározása autoradiográfiával. Az *in vivo* UDS-vizsgálatokban lehetőleg patkánymájat kell használni. Májszövetektől eltérő szövetek is használhatók, de ezek nem képezik e módszer tárgyát.

Az UDS-reakció észlelése a károsodás helyén a kivágott és helyettesített DNS-bázisok számától függ. Ezért tehát az UDS-vizsgálat különösen értékes az anyag által indukált hosszú szakaszú („long-patch reparáció” 20–30 bázispár) észlelésére. Ezzel ellentétben a rövid szakaszú („short-patch reparáció” 1–3 bázis) jóval kisebb érzékenységgel észlelhető. Ezenkívül mutagén hatások jöhetnek létre DNS-elváltozások helyre nem állítása, nem megfelelő helyreállítása vagy hibás replikációja miatt. Az UDS-reakció mértéke nem ad jelzést a reparációs folyamat megbízhatóságáról. Ezenkívül előfordulhat, hogy valamely mutagén reakcióba lép a DNS-sel, de nem történik meg a DNS-károsodás helyreállítása kivágásos reparáció révén (excision repair). A mutagénaktivitással kapcsolatban az UDS-vizsgálat által biztosított speciális információk hiányát e végpontnak a potenciális érzékenysége kompenzálja, mivel ennek mérése a teljes genomban történik.

Lásd még az Általános bevezetés B. részét is.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Reparálódó sejtek: a vizsgálatot végző laboratórium által előre megadott értéknél magasabb nettó sejtmagi szemcseszám (net nuclear grain, NNG).

Nettó sejtmagi szemcseszám (NNG): az autoradiográfiás UDS-vizsgálatokban az UDS-aktivitás kvantitatív mértéke, amit úgy lehet megkapni, hogy a sejtmagi szemcsék számából (NG) le kell vonni a sejtmaggal azonos területű citoplazmára eső szemcsék számát(CG): NNG = NG – CG. Minden egyes sejthez ki kell számítani az NNG-számokat, majd valamennyi tenyészetre és a párhuzamos tenyészetre is.

▼B

Nem ütemezett DNS-szintézis (UDS): kémiai anyagok vagy fizikai ágensek által indukált DNS-károsodást tartalmazó szakasz kivágása és eltávolítása után végbemenő reparációs DNS-szintézis.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az emlősmáj-sejtekkel végrehajtott *in vivo* UDS-vizsgálat a kémiai anyagok vagy fizikai ágensek által indukált DNS-károsodást tartalmazó szakasz kivágása és eltávolítása után végbemenő reparációs DNS-szintézis. A vizsgálat rendszerint ^{3}H-TdR-nek a májsejtek DNS-ébe való beépítésén alapul, ahol csak kisszámú sejt található az S-fázisban. A ^{3}H-TdR felvételét rendszerint autoradiográfiásan határozzuk meg, mivel e módszer kevésbé érzékeny az S-fázisú sejtek zavaró hatására, mint például a folyadékszcintillációs módszer.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Előkészületek**

1.4.1.1. A kísérlethez felhasznált állatok

Rendszerint patkányokat használnak, de bármilyen megfelelő emlős használata szóba jöhet. Fiatal, egészséges, ivarérett, kísérleti célokra tenyésztett laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat használnak. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól, és a nemenkénti átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözhet.

1.4.1.2. Tartási és etetési körülmények

Az Általános bevezetés B. részében ismertetett általános körülményeket kell alkalmazni, bár a páratartalom értékének 50–60 % között kell lennie.

1.4.1.3. Az állatok előkészítése

Az egészséges, fiatal, ivarérett állatokat véletlenszerűen kontroll- és kezelt csoportokba osztják. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek az elhelyezés miatti esetleges hatások. Ezt követően az állatokat egyenként kell azonosítani. Az állatokat legalább öt napig szoktatják a laboratóriumi körülményekhez.

1.4.1.4. Vizsgált anyag/előkészület

Az adagolás előtt a szilárd vizsgált anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni megfelelő oldószerekben vagy vivőanyagokban, és hígítani, ha szükséges. A folyékony vizsgált anyagok közvetlenül adagolhatók vagy hígíthatók. A vizsgált anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve ha az anyag tárolás során való stabilitása bizonyított.

1.4.2. **Vizsgálati körülmények**

1.4.2.1. Oldószer/vivőanyag

Az oldószer nem okozhat toxikus hatásokat a kiválasztott dózisok mellett, valamint nem alkalmazható olyan anyag, amely gyaníthatóan kémiai reakcióba lép a vizsgált anyaggal. Jól ismert oldószerektől eltérő oldószerek/vivőanyagok használatakor azok felhasználását alá kell támasztani a kompatibilitásukat bizonyító adatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát kell megfontolni.

▼B

1.4.2.2. Kontrollok

Minden kísérlethez egyidejűleg pozitív és negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollokat alkalmazunk. A vizsgált anyaggal való kezelés kivételével a kontrollcsoportokba beosztott állatokat azonos bánásmódban kell részesíteni a kezelt csoportokban lévő állatokkal.

A pozitív kontrollanyagoknak olyan anyagoknak kell lenniük, amelyekről ismert, hogy létrehoznak UDS-t olyan expozíciós szinten való beadáskor, amelyről várható, hogy a háttérszintet meghaladó észlelhető növekedést biztosít. Azon pozitív kontrollokat, amelyek metabolikus aktiválást igényelnek, olyan dózisban kell alkalmazni, ami mérsékelt reakciót vált ki (4). A dózisokat úgy választjuk ki, hogy a hatás egyértelmű legyen, de ne lepleződjön le azonnal a kódolt tárgylemezek identitása a leolvasásnál. A következő pozitív kontrollanyagok jöhetnek szóba:

Mintaveteli idők	Anyag	CAS-szám	EINECS-szám
Korai mintavételi idők (2–4 óra)	N-Nitrozo-dimetil-amin	62-75-9	200-249-8
Késői mintavételi idők (12–16 óra)	2-acetamido-fluorén (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Más megfelelő pozitív kontrollanyagok is használhatók. Elfogadható a pozitív kontrollanyagok vizsgált anyagtól eltérő módon való adagolása.

1.5. A KÍSÉRLET VÉGREHAJTÁSA

1.5.1. **Állatok száma és neme**

Megfelelő számú állatot kell használni, azért hogy a vizsgált anyagra adott reakció során a természetes biológiai eltérést figyelembe lehessen venni. Csoportonként legalább három elemezhető állatnak kell lennie. Ahol az eddigiek során már jelentős adatbázist gyűjtöttünk össze, csak egy vagy két kísérleti állat szükséges az egyidejűleg alkalmazott negatív és pozitív kontrollcsoportokhoz.

Ha a tanulmány végrehajtásakor rendelkezésre állnak olyan adatok azonos fajták és azonos expozíciósmód használata mellett, amelyek azt mutatják, hogy nincsenek jelentős különbségek a nemek között a toxicitás tekintetében, elegendő lesz egyetlen nemhez tartozó állatok, lehetőleg a hímek vizsgálata. Ahol az emberek esetében az expozíció nemre jellemző lehet, mint például néhány gyógyszer esetében, a vizsgálatot a megfelelő nemű állatokkal kell elvégezni.

1.5.2. **Kezelési menetrend**

A vizsgált anyagot rendszerint egyetlen adagban adjuk be.

1.5.3. **Dózisok**

Rendszerint legalább két dózist használnak. A legmagasabb adag az a dózis, ami olyan egyértelmű toxicitásjeleket vált ki, hogy annál magasabb adagok, azonos adagolás mellett, várhatóan halált okoznak. Az alacsonyabb dózis a legmagasabb dózis 25–50 %-a.

▼B

Specifikus biológiai hatású anyagok alacsony, nem toxikus adagok mellett (ilyenek például a hormonok és mutagének), adott esetben lehetséges, hogy nem felelnek meg az adagolási kritériumoknak, ezért ezeket eseti alapon kell értékelni. Ha dózisbehatároló vizsgálatot végeznek, mivel nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok, ezt ugyanazon laboratóriumban, ugyanazon fajok, törzs, nem és kezelési rendszer használatával kell elvégezni, mint amelyet a fő vizsgálatban alkalmazunk.

A legnagyobb adag olyan adagként határozható meg, amely a májban a toxicitás valamilyen jelzését (például piknotikus nukleusz) váltja ki.

1.5.4. **Határérték-vizsgálat**

Ha egyetlen alkalommal vagy ugyanazon a napon két adagban beadott, legalább 2 000 mg/kg testsúlydózis mellett végrehajtott vizsgálat semmilyen megfigyelhető toxikus hatást nem hoz létre, és ha nem várható genotoxicitás szerkezetileg rokon anyagokkal kapcsolatos adatok alapján, akkor nem szükséges a teljes vizsgálatot elvégezni. A várt expozíciós hatások az embernél a határérték-vizsgálatban valamilyen magasabb dózis használatának szükségességét jelezhetik.

1.5.5. **Adagolás**

A vizsgált anyagot rendszerint gyomorszondán át inkubációs kanül segítségével, vagy hasüregbe adott injekció segítségével adják be. Elfogadhatók egyéb expozíciós módok, amennyiben azok indokolhatók. Azonban a hasüregbe való beadás nem ajánlott, mivel ez közvetlenül teheti ki a májat a vizsgált anyag hatásának ahelyett, hogy ez a keringési rendszeren keresztül történne. A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata nem haladhatja meg a 2 ml/100 g testsúly mennyiséget. Ennél nagyobb mennyiségek használatát meg kell indokolni. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy maró anyagok kivételével, a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi dózisszinten konstans mennyiséget lehessen adagolni a kísérleti állatoknak.

1.5.6. **Májsejtek preparációja**

Májsejteket rendszerint 12–16 órával az adagolás után kell venni a kezelt állatokból. Általában szükség van egy további korai mintavételre (rendszerint a kezelés után 2–4 órával), ha nem jön létre egyértelmű, pozitív reagálás a kezelés után 12–16 órával. Azonban használhatók más mintavételi idők, amikor ez indokolt a toxikokinetikai adatok alapján.

Az emlősmáj-sejtek rövid idejű (short term) tenyészeteit rendszerint úgy hozzák létre, hogy a májon *in situ* átáramoltatnak kollagenázt, és lehetővé teszik, hogy a frissen disszociált májsejtek hozzátapadjanak valamilyen alkalmas felülethez. A negatív kontrollállatokból származó májsejteknek legalább 50 %-os életképességűeknek kell lenniük (5).

1.5.7. **UDS meghatározása**

Frissen izolált emlősmáj-sejteket inkubálunk ^{3}H-TdR-t tartalmazó táptalajjal megfelelő időtartamig, például 3–8 órán át. Az inkubációs időszak végén a tápfolyadékot el kell távolítani a sejtekből, amely ekkor többlet, nem megjelölt timidint tartalmazó tápfolyadékkal inkubálható a be nem épült radioaktivitás eltávolítása érdekében („cold chase”). A sejteket ezután le kell öblíteni, fixálni és szárítani. Hosszabb inkubációs idők esetén a cold chase elmaradhat. A lemezeket autoradiografiás emulzióba kell meríteni, sötétben tárolni (például 7–14 napig hűtött helyen tartják), előhívni, megfesteni, majd meg kell számolni az exponált ezüstszemcséket. 2–3 lemezt kell preparálni minden egyes állathoz.

▼B

1.5.8. **Elemzés**

A tárgylemez-preparátumoknak elegendő normál morfológiájú sejtet kell tartalmazniuk ahhoz, hogy elvégezhető legyen az UDS (helyzetet hűen kifejező) kiértékelése. A készítményeket mikroszkóp segítségével vizsgálják meg a nyilvánvaló citotoxicitás jeleit (például piknózis, radioaktív-jelölés csökkent értékei) keresve.

A tárgylemezeket kódolni kell a szemcseszámlálás előtt. Rendszerint 100 sejtet kell kiértékelni minden egyes állat esetében legalább két tárgylemezről; indokolni kell az állatonként kevesebb mint 100 sejt értékelését. Az S-fázisú sejtmagok felett nem kell szemcséket számolni, de feljegyezhető az S-fázisú sejtek aránya.

Alkalmas módszerekkel meg kell határozni a ^{3}H-TdR beépülési arányát a morfológiailag normál sejtek sejtmagjába és citoplazmájába úgy, ahogyan azt az ezüstszemcsék lerakódása mutatja.

2. **ADATOK**

2.1. EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Meg kell adni az egyes tárgylemezekhez és állatokhoz tartozó adatokat. Ezenkívül táblázat formájában össze is kell foglalni minden adatot. Minden egyes sejthez, minden állathoz és minden adaghoz és időhöz ki kell számítani a nettó sejtmagi szemcseszámokat (NNG), amelyet a CG-számoknak az NG-számokból való kivonásával kapunk meg. Ha megszámláljuk a „helyreállított sejteket”, indokoltnak és történeti vagy párhuzamos negatív kontrolladatokon alapulónak kell lennie a „helyreállított sejtek” kifejezés meghatározása kritériumának. A számszerű eredmények statisztikai módszerekkel kiértékelhetők. Ha használunk statisztikai vizsgálatokat, azokat még a kísérlet elvégzése előtt kell kiválasztani, és azt indokolni kell.

2.2. EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

Példák a pozitív/negatív reakció meghatározásának kritériumára:

pozitív
- i. laboratóriumi történeti adatok alapján indokolt, előre beállított küszöbérték fölötti NNG-értékek vagy
- ii. az egyidejűleg elvégzett kontrollnál lényegesen nagyobb NNG-értékek;

negatív
- i. a történeti kontroll küszöbérték alatti NNG-értékek; vagy
- ii. az egyidejűleg elvégzett kontrollnál nem lényegesen nagyobb NNG-értékek.

▼B

Meg kell vizsgálni az adatok biológiai jelentőségét, azaz figyelembe kell venni az olyan paramétereket, mint például az állatok közötti eltérés, dózis-reakció viszony és citotoxicitás. Statisztikai módszerek használhatók a vizsgálati eredmények kiértékelésének elősegítésére. Azonban nem szabad, hogy a statisztikai szignifikancia legyen az egyetlen meghatározó tényező valamely pozitív reagálás megállapítására.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ritka esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul az is, hogy az eredmények többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradhatnak tekintet nélkül arra, hogy hány alkalommal ismételjük meg a kísérletet.

Az emlősmáj-sejtekkel végrehajtott *in vivo* UDS-vizsgálatból kapott pozitív eredmény azt jelzi, hogy valamely vizsgált anyag olyan *in vivo* DNS-károsodást idéz elő emlősmáj-sejtekben, amely *in vitro* reparálható nem ütemezett DNS-szintézissel. A negatív eredmény azt jelzi, hogy a vizsgálati körülmények között a vizsgált anyag nem idéz elő e vizsgálattal észlelhető DNS-károsodást.

Értékelni kell annak a valószínűségét, hogy a vizsgált anyag vagy annak metabolitjai eljutnak-e az általános keringési rendszerbe, illetve kifejezetten a célszövetbe (például szisztematikus toxicitás).

3. **JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés tartalmazza a következő információkat:

Oldószer/vivőanyag:

— az oldószer kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Kísérleti állatok:

— használt fajok/törzs,

— állatok száma, kora és neme,

— az állatok származása, tartási körülmények, étrend stb.,

— az állatok súlya a vizsgálat kezdetekor, az egyes csoportok esetében a testsúlytartományt, átlagértéket és a standard eltérést is ideértve.

Vizsgálati körülmények:

— pozitív és negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollanyagok,

— a dózisbehatároló vizsgálatból kapott adatok, ha történt ilyen vizsgálat,

— a dózisok kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált anyag előkészítésére vonatkozó részletek,

— a vizsgált anyag beadására vonatkozó részletek,

— a beadási mód megindoklása,

— módszerek annak ellenőrzésére, hogy elérte-e a vizsgált anyag az általános keringési rendszert vagy cél szövetet, ha vannak ilyenek,

▼B

— átszámítás a vizsgált anyagnak a táplálékban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/kg testsúly/nap), ha ez alkalmazható,

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek,

— kezelési és mintavételi menetrendek részletes leírása,

— toxicitás mérésének módszerei,

— májsejt preparálásának és tenyésztésének módszere,

— a használt autoradiográfiás módszer,

— elkészített tárgylemezek száma és értékelt sejtek száma,

— értékelési kritériumok,

— az arra vonatkozó kritériumok, hogy mikor kell a vizsgálatokat pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen magyarázhatónak tekinteni.

Eredmények:

— lemezenkénti, állatonlénti és csoportonkénti sejtmagi és citoplazmai szemcseszámátlagok, nettó sejtmagi szemcseszámátlagok,

— dózis-reakció viszony, ahol lehetséges,

— statisztikai elemzések, ha vannak,

— toxicitás jelei,

— az egyidejűleg elvégzett negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrollokra vonatkozó adatok,

— történeti negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrolladatok tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel,

— a „helyreállított” sejtek száma, ha meghatározásra került,

— az S-fázisú sejtek száma, ha meghatározásra került,

— a sejtek életképessége.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások

4. **SZAKIRODALOM**

(1) Ashby, J. Lefevre, P. A., Burlinson, B. és Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In vivo* Rat. Hepatocyte DNA Repair Assay, Mutation Res., 156., pp. 1–18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In vivo* Rat. Hepatocyte DNA Repair Assay, Mutation Res., 189., pp. 123–133.

(3) Kennelly, J. C, Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell, I. de G. (1993), *In vivo* Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds), Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II. revised. Cambridge University Press. Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52–77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S. W., 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, pp. 263–285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl. C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo*/*In vitro* DNA Repair Assay (UDS), Mutation Res., 291, pp. 21–27.

(6) Mirsalis, J. C, Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo*/*In vitro* Hepalocyte DNA Repair Assay, Environ. Mutagen, 4, pp. 553–562.

▼M8

B.40. *IN VITRO* BŐRKORRÓZIÓ: TRANSZKUTÁN ELEKTROMOS REZISZTENCIA (TER) VIZSGÁLATI MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 430. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A bőrkorrózió valamely vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, amely a felhámon át az irhára is átterjedő látható szövetelhalást okoz [az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet ([1])) meghatározottak szerint]. Ez a továbbfejlesztett B.40. vizsgálati módszer olyan *in vitro* eljárást biztosít, amely lehetővé teszi a korróziót nem okozó és korróziót okozó anyagok és keverékek ENSZ GHS (1) és CLP-rendelet szerinti meghatározását.

2. A bőrkorrózió felmérése jellemzően kísérleti állatokon történő vizsgálatot foglal magában (az OECD eredetileg 1981-ben elfogadott, majd 1992-ben, 2002-ben és 2015-ben felülvizsgált 404. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű B.4. vizsgálati módszer alkalmazásával) (2). E B.40. vizsgálati módszer mellett a vegyi anyagok bőrkorróziós hatásának vizsgálatára szolgáló más *in vitro* vizsgálati módszereket is validáltak és elfogadtak – az OECD 431. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű – B.40bis. vizsgálati módszerként (3) és – az OECD 435. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű – B.65. vizsgálati módszerként (4), amelyek igény szerint alkalmazhatók a korrozív vegyi anyagok alkategóriáinak azonosítására is. Az OECD 439. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű (5) B.46. vizsgálati módszer keretében pedig elfogadtak több, a bőrirritáció felmérésére szolgáló validált *in vitro* vizsgálati módszert. A bőrkorróziós és bőrirritációs vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló OECD-iránymutatás több, különböző információforrásokat és adatelemző eszközöket csoportosító modult ismertet, továbbá iránymutatást nyújt arra nézve, i. hogyan integrálhatók és használhatók az ismert vizsgálati és nem vizsgálati eredetű adatok a vegyi anyagok potenciális bőrirritációs és bőrkorróziós hatásainak felmérésére, és ii. javaslatot tesz egy, a további vizsgálatok szükségessége esetén alkalmazható megközelítésre (6).

3. Ez a vizsgálati módszer a bőrkorrózióval mint az emberi egészség károsodásának egyik végpontjával foglalkozik. Alapja a patkánybőr transzkután elektromos rezisztenciáját (TER) mérő vizsgálati módszer, amelynek keretében bőrkorongokat használnak korrozív anyagok azonosítására, vizsgálva a normál *stratum corneum* integritására és barrierfunkciójára gyakorolt károsító hatásukat. A módszernek megfelelő, eredetileg 2004-ben elfogadott OECD vizsgálati iránymutatást az IATA-iránymutatás fényében 2015-ben módosították.

4. Az *in vitro* bőrkorróziós vizsgálatok szabályozási célú értékelése érdekében elvégezték a bőrkorrózió felmérésére szolgáló, patkánybőr használatán alapuló TER vizsgálati módszer elővalidálási vizsgálatait (7), majd a hivatalos validálási vizsgálatát (8) (9) (10) (11). E vizsgálatok eredményei

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

▼M8

vezettek ahhoz az ajánláshoz, hogy a TER vizsgálati módszer (validált referenciamódszer - VRM) használható szabályozási célú *in vivo* bőrkorrózió felmérésére (12) (13) (14).

5. Mielőtt az *in vitro* TER bőrkorróziós vizsgálati módszerhez hasonló vagy ahhoz képest módosított, a validált referenciamódszertől eltérő javasolt módszer szabályozási célú alkalmazásra kerülne, a validált referenciamódszerhez való hasonlóságának biztosítása érdekében a teljesítményszabványok (15) követelményeinek megfelelően meg kell határozni a javasolt felhasználása tekintetében fennálló megbízhatóságát, relevanciáját (pontosságát) és korlátait. Az adatok OECD-megállapodás szerinti kölcsönös elfogadása csak azután garantált, hogy a teljesítményszabványok szerint javasolt új vagy átdolgozott vizsgálati módszert felülvizsgálták és belefoglalták az OECD megfelelő vizsgálati iránymutatásába.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

6. Az alkalmazott fogalmak meghatározása a függelékben található.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

7. A validálási vizsgálat (10) és más közzétett tanulmányok (16) (17) szerint a patkánybőr TER vizsgálati módszer egy 122 anyagból álló adatbázis tekintetében 94 %-os (51/54) összérzékenységgel és 71 %-os specificitással (48/68) képes megkülönböztetni ismert bőrkorróziót okozó és bőrkorróziót nem okozó anyagokat.

8. Ez a vizsgálati módszer a bőrkorrózió azonosítására szolgáló *in vitro* eljárás. Lehetővé teszi, hogy az ENSZ által kidolgozott GHS és a CLP-rendelet szerint megkülönböztessék a korróziót nem okozó és a korróziót okozó vizsgálati vegyi anyagokat. E vizsgálati módszer korlátai közé tartozik – ahogyan az a validálási vizsgálatokból kiderült (8) (9) (10) (11) –, hogy nem teszi lehetővé a korrozív anyagoknak és keverékeknek az ENSZ GHS és a CLP-rendelet szerinti alkategóriákba sorolását. A vizsgálati módszer jövőbeni használatát a vonatkozó szabályozási keret fogja meghatározni. Ez a vizsgálati módszer ugyan nem biztosít elegendő információt a bőrirritáció felméréséhez, de a B.46. vizsgálati módszer célja kifejezetten az, hogy a bőrirritációs egészségügyi hatásokat *in vitro* határozza meg (5). Egyetlen bőrexpozíció után a bőrt ért helyi hatások teljes kiértékeléséhez az integrált vizsgálati és értékelési megközelítésekről szóló OECD-iránymutatást kell tanulmányozni (6).

9. A vizsgálati módszert alátámasztó validálás során igen sokféle, többségében különálló anyagot képviselő vegyi anyagot vizsgáltak, és a validálási vizsgálat empirikus adatbázisa összesen 60 anyagot tartalmazott, amelyek lefedik a kémiai osztályok széles körét (8) (9). Az összes rendelkezésre álló adat alapján a vizsgálati módszer a legkülönbözőbb kémiai osztályokra és halmazállapotokra, azon belül folyadékokra, félszilárd, szilárd és viaszos állagú anyagokra alkalmazható. Mivel azonban bizonyos halmazállapotok tekintetében nem állnak rendelkezésre könnyen hozzáférhető, megfelelő referenciaadatokkal bíró vizsgálati tételek, a validálás során viszonylag csekély számú viaszos állagú és korrozív szilárd anyag került felmérésére. A folyadékok lehetnek vizesek vagy nem vizesek; a szilárd anyagok lehetnek vízben oldódóak vagy oldhatatlanok. Olyan esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a vizsgálati módszer nem alkalmazható valamely konkrét anyagkategóriára, a vizsgálati módszert nem szabad az adott anyagkategóriára alkalmazni. E vizsgálati módszerről feltételezhető továbbá, hogy az anyagokra való alkalmazhatóságának kiterjesztéseként keverékekre is alkalmazható. Mivel azonban a keverékek kategóriák és összetételek széles körét fedik le, és jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a keverékek vizsgálatára vonatkozóan, azokban az esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a vizsgálati módszer valamely konkrét keverékkategóriára nem alkalmazható (pl. az Eskes és munkatársai, 2012 által javasolt stratégia alapján) (18), a vizsgálati módszer az adott keverékkategóriára nem alkalmazható. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő

▼M8

eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény. Gázokat és aeroszolokat validálási vizsgálatok keretében még nem vizsgáltak (8) (9). Bár elképzelhető, hogy ezek is vizsgálhatók TER vizsgálati módszerrel, a jelenlegi vizsgálati módszer nem teszi lehetővé gázok és aeroszolok vizsgálatát.

A VIZSGÁLAT ELVE

10. A vizsgálati vegyi anyagot 24 órán át a bőrkorongok epidermális felületén alkalmazzák egy kétkamrás vizsgálati rendszerben, amelyben a bőrkorongok a két kamra elválasztására szolgálnak. A bőrkorongok kíméletes módon leölt, 28–30 napos patkányokról származnak. A korrozív vegyi anyagok azok, amelyek a normál *stratum corneum* integritásának és barrierfunkciójának elvesztését okozzák, amit a TER meghatározott határérték alá történő csökkenésével mérnek (16) (lásd a 32. pontot). A patkánybőr TER esetében az 5 kΩ határérték került kiválasztásra a széles tartományt felölelő anyagok nagyszámú adataiból, ahol az értékek túlnyomó többsége vagy világosan ezen érték felett (gyakran > 10 kΩ) vagy jóval alatta (gyakran < 3 kΩ) volt (16). Általában azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek az állatokra nézve nem korrozívak, de irritálók vagy nem irritálók, nem csökkentik a TER-t e határérték alá. Továbbá más bőrkészítmények vagy más berendezés használata módosíthatja a határértéket, ami további validálásokat tesz szükségessé.

11. A TER-ben a pozitív értékek – beleértve az 5 kΩ körülieket is – kontrollvizsgálata céljából a vizsgálati eljárás részét képezi egy festékmegkötést biztosító lépés is. A festékmegkötést biztosító lépés meghatározza, hogy az ionáteresztő képesség fokozódását a *stratum corneum* fizikai károsodása okozza-e. A patkánybőrt alkalmazó TER módszer a B.4. vizsgálati módszer (2) alapján vizsgált nyúlban előre jelezte az *in vivo* korrozivitást.

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

12. Az e vizsgálati módszerhez kapcsolódó patkánybőr TER vizsgálati módszer rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1. táblázatban ajánlott tizenkét jártassági tesztanyag helyes osztályozásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Ha a jegyzékben szereplő valamely anyag nem áll rendelkezésre, illetve ha indokolható, megfelelő *in vivo* és *in vitro* referenciaadatokkal rendelkező más – például a referencia-vegyianyagok jegyzékében feltüntetett (16) – anyag is használható, amennyiben a kiválasztási kritériumok megegyeznek az 1. táblázatban foglaltakkal.

1. táblázat

A jártassági tesztanyagok jegyzéke ([1])

Anyag	CAS-szám	Kémiai osztály ([2])	ENSZ GHS/CLP szerinti, in vivo eredményeken alapuló kat. ([3])	VRM szerinti, in vitro eredményeken alapuló kat.	Halmazállapot	pH ([4])
In vivo korrozív hatású						
N,N'-Dimetil-dipropiléntriamin	10563-29-8	szerves bázis	1A	6 × C	F	8,3
1,2-Diaminopropán	78-90-0	szerves bázis	1A	6 × C	F	8,3

▼**M8**

Anyag	CAS-szám	Kémiai osztály ([2])	ENSZ GHS/CLP szerinti, in vivo eredményeken alapuló kat. ([3])	VRM szerinti, in vitro eredményeken alapuló kat.	Halmazállapot	pH ([4])
In vivo korrozív hatású						
Kénsav (10 %)	7664-93-9	szervetlen sav	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × NK	F	1,2
Kálium-hidroxid (10 %-os aq.)	1310-58-3	szervetlen bázis	(1A/)1B/1C	6 × C	F	13,2
Oktánsav (kaprilsav)	124-07-2	szerves sav	1B/1C	4 × C 2 × NK	F	3,6
2-terc-Butilfenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 × C 2 × NK	F	3,9
In vivo nem korrozív hatású						
Izosztearinsav	2724-58-5	szerves sav	NK	6 × NK	F	3,6
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	szerves bázis	NK	6 × NK	Sz	5,5
Fenetil-bromid	103-63-9	elektrofil	NK	6 × NK	F	3,6
4-(Metil-tio)-benzaldehid	3446-89-7	elektrofil	NK	6 × NK	F	6,8
1,9-Dekadién	1647-16-1	semleges szerves	NK	6 × NK	F	3,9
Tetraklór-etilén	127-18-4	semleges szerves	NK	6 × NK	F	4,5

Rövidítések: aq = vizes; CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; VRM = Validált referenciamódszer; C = korrozív; NK = Nem korrozív

([1]) A jártassági tesztanyagok – amelyek felsorolása elsőként korrozív és nem korrozív hatásuk szerint, majd korrozivitási alkategóriák szempontjából, végül pedig kémiai osztályuk alapján történt – a patkánybőr TER vizsgálati módszer ECVAM által végzett validálási vizsgálatában használt anyagok közül kerültek kiválasztásra (8) (9). Ha nincs másképpen feltüntetve, az anyagokat a kereskedelmi forrásból való beszerzésükkor tapasztalt tisztasági szinten vizsgálták (8). A lehetőségekhez mérten olyan anyagok kerültek kiválasztásra, amelyek: i. a validált referenciamódszer által mérhető vagy előrevetíthető korrozivitási válaszreakciók tartományának tekintetében reprezentatívak (pl. nincs korrozív hatásuk; enyhétől az erősig terjedő korróziós hatást váltanak ki); ii. a validálási vizsgálatban használt kémiai osztályok tekintetében reprezentatívak; iii. tükrözik a validált referenciamódszer teljesítményi jellemzőit; iv. jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek; v. egyértelmű eredményeket hoznak az *in vivo* referenciavizsgálati módszer alkalmazásakor; vi. kereskedelmi forgalomban kaphatók; és vii. nem kapcsolódnak hozzájuk kiemelkedően magas ártalmatlanítási költségek.

([2]) A Barratt és társai szerinti kémiai osztály (8).

([3]) Az ENSZ GHS/CLP-rendelet szerinti 1A, 1B és 1C kategóriának az ENSZ I., II. és III. csomagolási csoportja felel meg.

([4]) A pH-értékek forrása a Fentem és társai (9), valamint a Barratt és társai (8).

▼M8

ELJÁRÁS

13. A patkánybőr TER bőrkorróziós vizsgálati módszerhez rendelkezésre állnak szabványműveleti eljárások (19). Az e vizsgálati módszer keretébe tartozó patkánybőr TER vizsgálati módszereknek az alábbi feltételeknek kell megfelelniük:

Állatok

14. Patkányokat kell használni, mert a bőrüknek a vizsgálati módszer során alkalmazható anyagokkal szembeni érzékenysége már korábban bebizonyosodott (12), emellett ez az egyetlen hivatalosan validált bőrforrás (8) (9). A patkányok kora (a bőr begyűjtésének időpontjában) és származása különösen fontos annak biztosítására, hogy a szőrtüszők nyugvó fázisban legyenek, mielőtt a felnőtt szőr nőni kezd.

15. A fiatal, körülbelül 22 napos, hím vagy nőstény patkányok (Wistar vagy hasonló törzs) háton és horpaszon lévő szőrét kis nyírógéppel óvatosan eltávolítják. Azután az állatokat óvatosan törölgetve megmossák, miközben a lenyírt területet antibiotikumot tartalmazó oldatba merítik (amely a baktériumok növekedését hatékonyan gátló koncentrációban például sztreptomicint, penicillint, klóramfenikolt és amfotericint tartalmaz). Az állatokat az első mosást követő harmadik vagy negyedik napon ismételten megmossák antibiotikummal, és a második mosást követő 3 napon belül felhasználják azokat, amikor a *stratum corneum* megerősödött a szőrtelenítés után.

A bőrkorongok előkészítése

16. Az állatokat 28–30 napos korukban kíméletes módon leölik; ez a kor kritikus. Ezután minden állatról eltávolítják a dorsolaterális bőrt, és a bőrtől való óvatos elválasztással lefejtik a felesleges szubkután zsírt. Egyenként körülbelül 20 mm-es átmérőjű bőrkorongokat távolítanak el. A bőrt a korongok felhasználása előtt tárolni lehet, ha kimutatható, hogy a pozitív és negatív kontrolladatok megegyeznek a friss bőrnél kapott adatokkal.

17. Minden bőrkorongot egy PTFE (politetrafluoroetilén) cső vége fölé helyeznek, biztosítva, hogy az epidermális felület érintkezzen a csővel. Egy „O” gumigyűrűt pontosan a cső végére illesztenek, hogy a helyén tartsa a bőrt, és a felesleges szövetet levágják. Az „O” gumigyűrűt aztán vazelinnel óvatosan tömítik a PTFE-cső végéhez. A csövet egy rugós csipesz tartja egy $MgSO_4$-oldatot (154 mM) tartalmazó befogadókamra belsejében (1. ábra). A bőrkorongot teljesen bele kell meríteni az $MgSO_4$-oldatba. Egyetlen patkánybőrből 10–15 bőrkorongot lehet készíteni. A cső és az „O” gyűrű méreteit a 2. ábra mutatja.

18. A vizsgálat kezdete előtt az egyes állati bőrök minőség-ellenőrzése céljából megmérik két bőrkorong TER-értékét. Mindkét korongnak 10 kΩ-nál nagyobb elektromosrezisztencia-értéket kell mutatnia ahhoz, hogy a többi korongot fel lehessen használni a vizsgálati módszerhez. Ha a rezisztencia értéke kisebb mint 10 kΩ, e bőrdarab többi korongját ki kell dobni.

A vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok alkalmazása

19. A vizsgálati modell megfelelő teljesítménye érdekében minden vizsgálatmenettel (kísérlettel) egyidejűleg pozitív és negatív kontrollokat kell végezni. Minden vizsgálatmenetben (kísérletben) egyetlen állatról származó bőrkorongokat kell használni. Az ajánlott pozitív, illetve negatív vizsgálati vegyi anyagok: 10 M sósav, illetve desztillált víz.

▼M8

20. A folyékony vizsgálati vegyi anyagokat (150 µl) a cső belsejében egyenletesen viszik fel az epidermális felületre. Szilárd anyagokkal történő vizsgálat esetén megfelelő mennyiségű szilárd anyagot egyenletesen visznek fel a korongra annak biztosítására, hogy az epidermisz teljes felületét beborítsa. A szilárd anyagra deionizált vizet (150 µl) öntenek, és a csövet óvatosan felrázzák. A bőrrel való maximális érintkezés elérése érdekében előfordulhat, hogy a szilárd anyagot 30 °C-ra fel kell melegíteni olvasztás vagy lágyítás céljából, illetve őrölni vagy porítani kell.

21. Minden vizsgálatmenet (kísérlet) során az egyes vizsgálati és kontrollanyagokhoz három bőrkorongot használnak. A vizsgálati vegyi anyagot 24 órán át alkalmazzák 20–23 °C-on. A vizsgálati vegyi anyagot legfeljebb szobahőmérsékletű csapvízsugárral addig mossák, amíg már nem lehet további anyagot eltávolítani.

TER-mérések

22. A bőr ellenállásának TER-ként történő mérése egy kisfeszültségű, váltakozó áramú Wheatstone-híd segítségével történik (18). A mérőeszköz általános jellemzői: 1–3 Volt üzemi feszültség, 50–1 000 Hz-es szinusz- vagy négyszöghullámú váltakozó áram és legalább 0,1–30 kΩ mérési tartomány. A validálási vizsgálatban használt mérőeszköz az induktivitást, kapacitást és rezisztenciát sorrendben 2 000 H, 2 000 µF és 2 MΩ értékekig méri 100 Hz-es vagy 1 kHz-es frekvencián, soros vagy párhuzamos értékek felhasználásával. A TER-mérések céljára a korrozivitásra vonatkozó vizsgálati méréseket elektromos ellenállásban rögzítik 100 Hz-es frekvencián és soros értékeket felhasználva. Az elektromos ellenállás mérése előtt a bőr felületi feszültségét megfelelő mennyiségű 70 %-os etil-alkohollal csökkentik, amely beborítja az epidermiszt. Néhány másodperc elteltével az etil-alkoholt eltávolítják a csőből, majd azután a szövetet 3 ml $MgSO_4$ -oldat (154 mM) hozzáadásával hidratálják. Az ellenállás kΩ/bőrkorongban való méréséhez a Wheatstone-híd elektródáit ráhelyezik a bőrkorong mindkét oldalára (1. ábra). Az elektróda méretei és a krokodilcsipeszek alatti elektródaszakasz hosszúsága a 2. ábrán látható. A belső elektródához csatolt csipesz az ellenállás mérésekor a PTFE-cső tetején található annak biztosítására, hogy állandó hosszúságú elektróda merüljön az $MgSO_4$-oldatba. A külső elektródát a befogadókamra belsejébe úgy helyezik el, hogy az a kamra aljáig érjen. A rugós csipesz és a PTFE-cső alja közötti távolságot állandó értéken tartják (2. ábra), mivel ez a távolság befolyásolja a kapott rezisztencia értékét. Következésképpen a belső elektróda és a bőrkorong közötti távolságnak állandónak és minimálisnak kell lenni (1–2 mm).

23. Ha a mért rezisztencia értéke nagyobb mint 20 kΩ, az valószínűleg a bőrkorong epidermális felületét borító vegyianyag-maradvány következménye. Ennek a bevonatnak az eltávolítása megkísérelhető például úgy, hogy kesztyűs hüvelykujjal befogják a PTFE csövet, és körülbelül 10 másodpercen át rázogatják; az $MgSO_4$-oldatot eltávolítják és a rezisztenciamérést friss $MgSO_4$-tal megismétlik.

24. A vizsgálati műszer jellemzői és méretei, valamint a használt vizsgálati eljárás befolyásolhatja a kapott TER-értékeket. Az 5 kΩ korróziós határértéket az ebben a vizsgálati módszerben leírt speciális műszerrel és eljárással kapott adatok alapján számolták ki. Ha a vizsgálati feltételek megváltoznak, vagy más készüléket használnak, előfordulhat, hogy eltérő határ- és kontrollértékeket kell alkalmazni. Ezért ajánlatos a módszert és az ellenállás határértékét a validálási vizsgálatban (8) (9) használt anyagokból vagy a vizsgált anyagokhoz hasonló kémiai osztályú anyagokból kiválasztott jártassági tesztanyagok sorozatának vizsgálatával meghatározni. A megfelelő jártassági tesztanyagok jegyzékét az 1. táblázat tartalmazza.

▼M8

Festékanyag-megkötő módszerek

25. Bizonyos nem korrozív anyagoknak való expozíció eredményezheti a rezisztencia 5 kΩ határérték alá történő csökkenését, ami lehetővé teszi az ionoknak a *stratum corneum*on való passzálását, csökkentve ezáltal az elektromos rezisztenciát (5). Például a semleges szerves és felületaktív anyagok (például a tisztítószerek, emulgeálószerek és más felületaktív anyagok) eltávolíthatják a bőrzsírt, ezáltal a barrier az ionok számára áthatolhatóbbá válik. Így ha az ilyen vegyi anyagok TER-értéke alacsonyabb mint 5 kΩ vagy akörül van, és nem tapasztalható látható károsodás a bőrkorongokon, a kontrollon és kezelt szöveteken festékpenetrációs vizsgálatot kell végezni annak megállapítására, hogy a kapott TER-érték a bőr fokozottabb áteresztő képességének vagy a bőrkorróziónak az eredménye-e (7) (9). Ez utóbbi esetén, amikor a *stratum corneum* szétrepedt, ha a bőrfelszínre szulforhodamin B festéket visznek fel, ez gyorsan áthatol, és megfesti az alatta lévő szövetet. Ez a különleges festékanyag az anyagok széles skálájának ellenáll, és nem érinti a lent leírt kivonási eljárás.

Szulforhodamin B festékanyag alkalmazása és eltávolítása

26. A TER-vizsgálatot követően a magnézium-szulfátot eltávolítják a csőből, és gondosan megvizsgálják, hogy a bőrön látható-e károsodás. Ha nincs nagyobb látható károsodás (pl. perforáció), szulforhodamin B festékanyag (Acid Red 52; C.I. 45100; CAS-szám: 3520-42-1), 150 µl 10 tömegszázalékos desztillált vizes oldatát alkalmazzák minden bőrkorong epidermális felületén 2 órán át. Ezeket a bőrkorongokat azután a felesleges/meg nem tapadt festékanyag eltávolítása érdekében körülbelül 10 másodpercig legfeljebb szobahőmérsékletű csapvízben lemossák. Minden egyes bőrdarabot gondosan eltávolítanak a PTFE-csőről és egy, deionizált vizet (8 ml) tartalmazó ampullába (például egy 20 ml-es üveg szcintillációs ampullába) helyezik. Az ampullákat óvatosan 5 percen át rázogatják minden felesleges/meg nem tapadt festékanyag eltávolítása érdekében. Ezt az öblítési eljárást megismétlik, azután a bőrkorongokat kiveszik, és desztillált vízben lévő 5 ml 30 tömegszázalékos nátrium-dodecil-szulfát (SDS) vizes oldatát tartalmazó ampullába helyezik, és egy éjszakán át 60 °C-on inkubálják.

27. Az inkubálást követően minden bőrkorongot eltávolítanak és kidobnak, a fennmaradó oldatot pedig 8 percen át 21 °C-on centrifugálják (relatív centrifugális erő ~175 × g). 1 ml felülúszót kivesznek, és felhígítanak 1:5 térfogatban [azaz 1 ml + 4 ml] arányban 30 % (tömegszázalékos) SDS-sel. Megmérik az oldat optikai sűrűségét (OD) 565 nm-nél.

A festékanyag-tartalom kiszámítása

28. Az OD-értékekből kiszámítják a korongonkénti szulforhodamin B festéktartalmat (9) (szulforhodamin B festék moláris extinkciós együtthatója 565 nm-en 8,7 × l04; molekulatömege 580 g). A festékanyag-tartalmat minden egyes bőrkorong esetében megfelelő kalibrációs görbe használatával meghatározzák, azután kiszámítják a párhuzamos vizsgálatok átlagos festékanyag-tartalmát.

Elfogadhatósági kritériumok

29. Az átlag TER-eredmények elfogadhatók, ha az egyidejű pozitív és negatív kontrollértékek a vizsgálati laboratóriumban a módszer elfogadható tartományába esnek. A fent leírt módszertanra és készülékre vonatkozó elfogadható ellenállás-tartományokat az alábbi táblázat tartalmazza:

▼**M8**

Kontroll	Anyag	Ellenállás-tartomány (kΩ)
Pozitív	10 M sósav	0,5–1,0
Negatív	Desztillált víz	10–25

30. Az átlagos festékanyag-megkötési eredmények azzal a feltétellel fogadhatók el, hogy az egyidejű kontrollértékek a módszer elfogadható tartományába esnek. A fent leírt módszertan és készülék esetében a kontrollanyagok tekintetében javasolt elfogadható festéktartalom-tartományokat az alábbi táblázat tartalmazza:

Kontroll	Anyag	Festéktartalom tartománya (μg/korong)
Pozitív	10 M sósav	40–100
Negatív	Desztillált víz	15–35

Az eredmények értelmezése

31. A TER határértékét, amely megkülönbözteti a korrozív és a nem korrozív vizsgálati vegyi anyagokat, a vizsgálati módszer optimalizálása során állapították meg, egy elővalidálási szakaszban tesztelték, és egy hivatalos validálási vizsgálatban igazolták.

32. Az ENSZ GHS/CLP-rendelet osztályozási rendszeréhez kapcsolódó patkánybőr TER bőrkorróziós vizsgálati módszer előrejelzési modellje (9) (19) az alábbiak szerint alakul:

A vizsgálati vegyi anyag a bőrre nem korrozív hatású anyagnak tekintendő:

i. ha a vizsgálati vegyi anyagra kapott átlagos TER-érték nagyobb mint (>) 5 kΩ; vagy

ii. a vizsgálati vegyi anyagra kapott átlagos TER-érték kisebb vagy egyenlő (≤) 5 kΩ-mal, és

— a bőrkorongok nem mutatnak látható károsodást (pl. perforációt), és

— a korong átlagos festéktartalma kisebb (<) a 10 M HCl egyidejű pozitív kontrollnál megállapított átlagos bőrkorong-festéktartalomnál (a pozitív kontrollértékeket lásd a 30. pontban).

A vizsgálati vegyi anyagnak a bőrre korrozív hatása van:

i. ha a vizsgálati vegyi anyagra kapott átlagos TER-érték kisebb vagy egyenlő (≤) 5 kΩ-mal, és a bőrkorongok láthatóan károsodtak (pl. perforálódtak), vagy

ii. a vizsgálati vegyi anyagra kapott átlagos TER-érték kisebb vagy egyenlő (≤) 5 kΩ-mal, és

— a bőrkorongok nem mutatnak látható károsodást (pl. perforációt), de

▼M8

— a korongok átlagos festéktartalma nagyobb vagy egyenlő (≥) a 10 M HCl egyidejű pozitív kontrollnál megállapított átlagos bőrkorong-festéktartalommal (a pozitív kontrollértékeket lásd a 30. pontban).

33. Ha a besorolás egyértelmű, legalább három bőrkorong replikátum vizsgálatából álló egyszeri vizsgálatmenetnek (kísérletnek) elegendőnek kell lennie az adott vizsgálati vegyi anyag esetében. Határértéken lévő eredmények esetében azonban, ha például az egyes bőrkorong replikátumok eredményei nem egyeznek és/vagy az átlagos TER-érték 5 ± 0,5 kΩ, megfontolandó egy második független vizsgálatmenet (kísérlet) lefolytatása, illetve ha az első és a második vizsgálatmenet (kísérlet) eredményei különbözőek, egy harmadiké is.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

34. A vizsgálati vegyi anyagokra, valamint a pozitív és negatív kontrollokra vonatkozó rezisztenciaértékeket (kΩ) és adott esetben a festékanyag-tartalom értékeket (μg/korong) táblázatos formában kell megadni, beleértve minden vizsgálatmenet (kísérlet) során az egyes bőrkorong replikátumok esetében kapott adatokat és az átlagértékeket ± szórással. A jelentésbe bele kell foglalni valamennyi megismételt kísérletet. A bőrkorongok esetleges károsodását minden vizsgálati vegyi anyag esetében fel kell tüntetni.

Vizsgálati jelentés

35. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag és kontrollként szolgáló anyagok:

— Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;

— Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek: lehetőség szerint az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai alapján jellemezve;

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— eredet, gyártási szám, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag/kontrollanyag kezelése a vizsgálatot megelőzően, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, felhasználási határideje vagy ismételt elemzésének napja, ha ismert;

— tárolási feltételek.

Kísérleti állatok:

— a használt törzs és nem;

— az állatok kora, ha donorállatként használják azokat;

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.;

— a bőrpreparátumra vonatkozó részletek.

▼**M8**

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgálati eszközökre vonatkozó kalibrációs görbék;

— a festékanyag-megkötő vizsgálat kiértékelésére vonatkozó kalibrációs görbék, az OD-értékek mérésekor használt sávszélesség és adott esetben a mérőeszköz (pl. a spektrofotométer) OD-linearitási tartománya;

— a TER-méréshez használt vizsgálati eljárás részletei;

— adott esetben a festékanyag-megkötő vizsgálatához használt vizsgálati eljárás részletei;

— az alkalmazott vizsgálati dózisok, az expozíciós időszak(ok) hossza és az expozíciós hőmérséklet(ek);

— az expozíciós időszak után alkalmazott mosási eljárás részletei;

— a vizsgálati vegyi anyagonként és kontrollonként (pozitív és negatív kontrollonként) használt bőrkorong replikátumok száma;

— a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása;

— hivatkozás a modellel kapott korábbi adatokra. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia:

  i) a pozitív és negatív kontrollok (kΩ-ban megadott) TER-értékének elfogadhatósága, tekintettel a pozitív és negatív kontrollok ellenállás-tartományára;

  ii) a pozitív és negatív kontrollok (μg/korongban megadott) festékanyag-tartalom értékének elfogadhatósága, tekintettel a pozitív és negatív kontrollok festékanyagtartalom-tartományára;

  iii) a vizsgálati eredmények elfogadhatósága, tekintettel a bőrkorong replikátumok adatainak korábbiakban tapasztalt változékonyságára;

— az alkalmazott döntési kritériumok/előrejelzési modell leírása.

Eredmények:

— A TER és a festékanyag-megkötő vizsgálat adatainak (ha releváns), ezek átlagának, szórásának (SD) és variációs koefficiensének (CV) táblázatba foglalása az egyes vizsgálati vegyi anyagokra és kontrollanyagokra, minden egyes vizsgálatmenetre (kísérletre) és valamennyi bőrkorong replikátumra (minden egyes állatra és minden egyes bőrmintára) vonatkozólag;

— bármilyen megfigyelt jelenség leírása;

— az alkalmazott előrejelzési modellel/döntési kritériumokkal összhangban kialakított osztályozás.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Elérhető a következő címen:[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

▼**M8**

(2) E melléklet B.4., Akut bőrirritáció/bőrkorrózió fejezete.

(3) E melléklet B.40bis, *In vitro* bőrmodell fejezete.

(4) E melléklet B.65., *In vitro* Membrán barrier vizsgálati módszer fejezete.

(5) E melléklet B.46., *In vitro* bőrirritáció: Rekonstruált emberi felhámmodellen végzett vizsgálati módszer című fejezete.

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In vitro* 12, 471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In vitro*12, 483-524.

(10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129-147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275–280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼M8

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.* 24, 507-512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol*. *In vitro* 6,191-194.

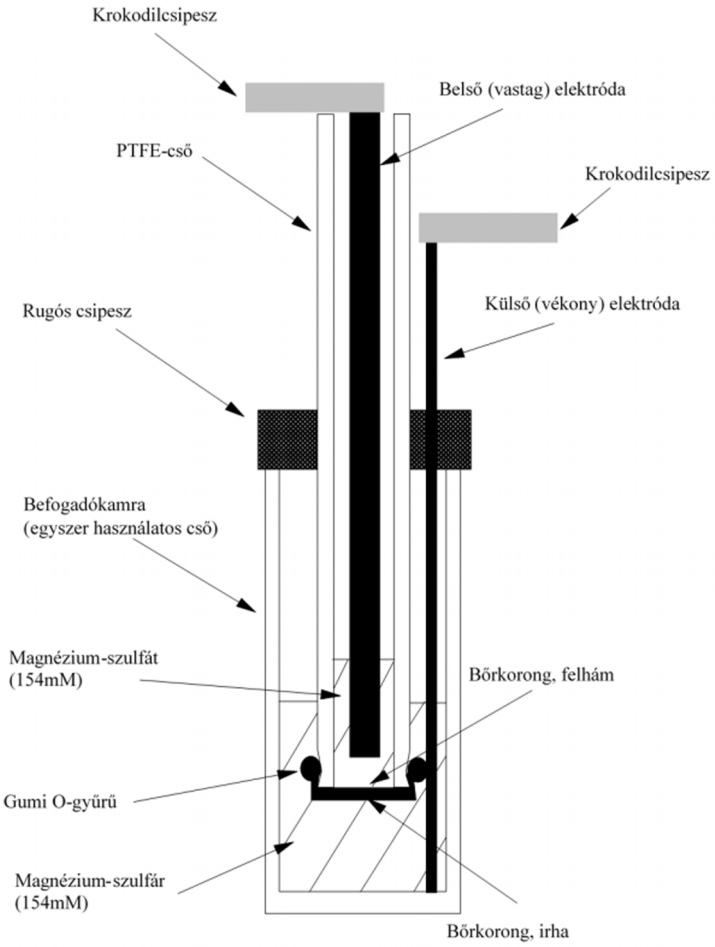
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.

(19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

1. ábra

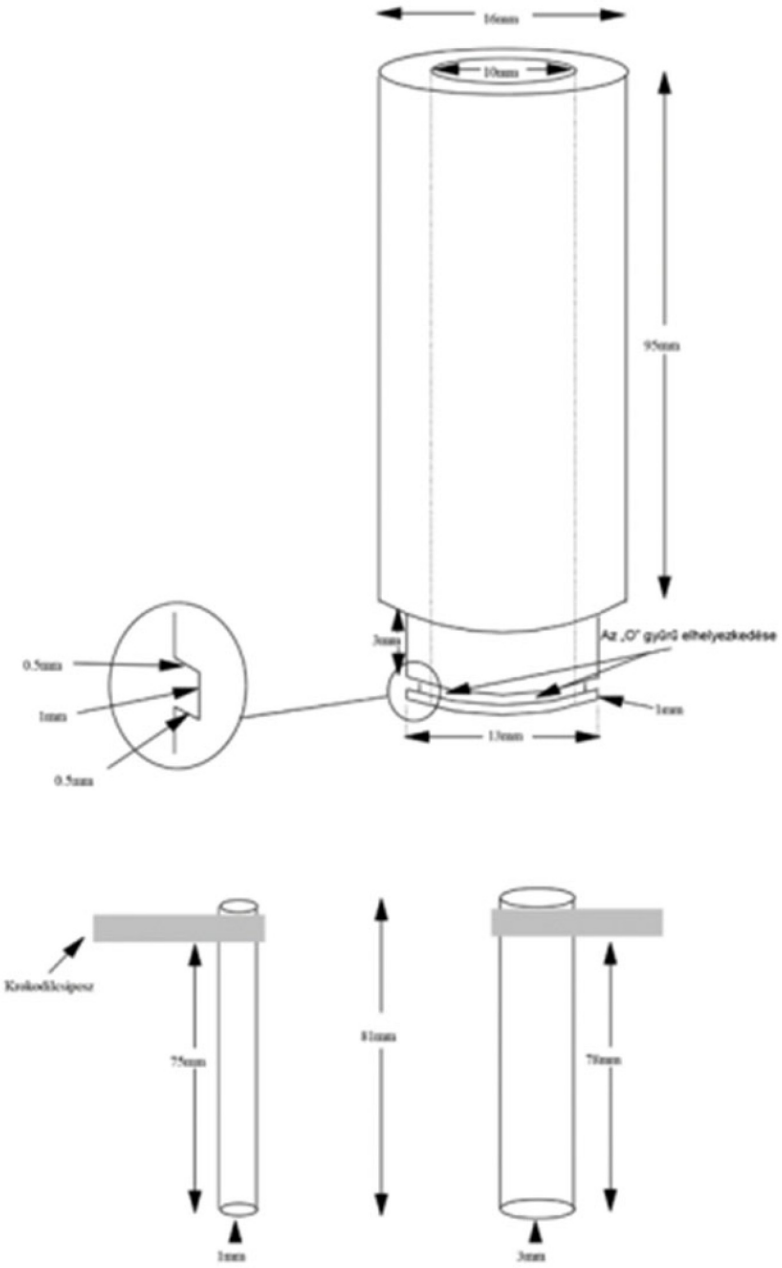
A Patkánybőr Ter-Vizsgálatára Szolgáló Műszer



▼**M8**

2. ábra

Az Alkalmazott Politetrafluoroetiléncső (Ptfe-cső) És Befogadó Cső, Valamint Az Elektródák Méretei



A fent ábrázolt eszközök legfontosabb elemei:

— a PTFE-cső belső átmérője,

— az elektródák PTFE-csőhöz és befogadó csőhöz viszonyított hosszúsága olyan legyen, hogy az elektródák ne érintkezzenek a bőrkoronggal, és hogy állandó hosszúságú elektróda legyen az $MgSO_4$-oldatban,

▼**M8**

— az $MgSO_4$-oldat befogadó csőben lévő mennyisége a PTFE-csőben lévő szinthez viszonyítva adjon egy bizonyos folyadékmélységet, ahogyan azt az 1. ábra mutatja,

— a bőrkorongot kellő erősséggel kell a PTFE-csőhöz rögzíteni úgy, hogy az elektromos ellenállás a bőr tulajdonságaira vonatkozóan valós értéket adjon.

▼M8

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezés” megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (20).

K: korrozív.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Egyezés: a kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. A kifejezést esetenként használják a pontosság megfelelőjeként, és úgy határozzák meg, mint a helyesen pozitívként vagy negatívként besorolt összes vizsgálati vegyi anyag aránya. Az egyezés nagy mértékben függ a vizsgálat tárgyát képező vizsgálati vegyi anyag típusaiban előforduló pozitív eredmények gyakoriságától (20).

GHS (a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az ENSZ által globálisan harmonizált rendszere): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

IATA: integrált vizsgálati és értékelési megközelítés.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

NK: nem korrozív.

OD: optikai sűrűség.

Pozitív kontroll: a vizsgálati elrendezés valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt rendszer. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

▼M8

Teljesítményszabványok: hitelesített referenciamódszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és iii. a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, hasonló megbízhatósági és pontossági szintek, amelyeket a javasolt vizsgálati módszernek teljesítenie kell a minimális jegyzék referencia-vegyianyagainak felhasználásával történő értékelése során.

Relevancia: a vizsgálati módszer és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálati módszer mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (20).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (20).

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálati módszer helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (20).

***In vivo** bőrkorrózió:*: a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően négy órán belül megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, azaz a felhámon át az irhára is átterjedő látható szövetelhalás. A korróziós tünetek jellemzően fekély, vérzés, véres hegesedés és – 14 napos megfigyelés végén – a bőr kifehéredése miatt elszíneződés, teljes szőrhullásos területek és hegek. A kérdéses lézió értékeléséhez figyelembe kell venni a kórszövettant.

Specificitás: a vizsgálati módszerrel helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (20).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálatmenet: egyetlen vizsgálati vegyi anyag egyidejű tesztelése legalább három bőrkorong replikátumon.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Transzkután elektromos rezisztencia (TER): a bőr elektromos rezisztenciájának mérése rezisztenciaértékként, kiloohmban kifejezve. A barrierfunkció vizsgálatának egy egyszerű és nagy teljesítményű módszere, amely során az ionok bőrön történő passzálását egy Wheatstone-híd segítségével rögzítik.

UVCB:: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, valamint komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

▼M8

B.40 bis. *IN VITRO* BŐRKORRÓZIÓ: REKONSTRUÁLT EMBERI FELHÁMMODELLEN VÉGZETT VIZSGÁLATI MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 431. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. A bőrkorrózió valamely vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, amely a felhámon át az irhára is átterjedő látható szövetelhalást okoz [az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet) ([1]) meghatározottak szerint]. Ez a továbbfejlesztett B.40bis. vizsgálati módszer olyan *in vitro* eljárást biztosít, amely lehetővé teszi a korróziót nem okozó és korróziót okozó anyagok és keverékek ENSZ GHS és CLP-rendelet szerinti meghatározását. Emellett lehetővé teszi a korrozív anyagok részleges alkategorizálását.

2. A vegyi anyagok bőrkorróziós hatásának felmérése jellemzően kísérleti állatokon történő vizsgálatot foglal magában (az OECD eredetileg 1981-ben elfogadott, majd 1992-ben, 2002-ben és 2015-ben felülvizsgált 404. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű B.4. vizsgálati módszer alkalmazásával) (2). E B.40bis. vizsgálati módszer mellett a vegyi anyagok bőrkorróziós hatásának vizsgálatára szolgáló két másik *in vitro* vizsgálati módszert is validáltak és elfogadtak, a B.40. vizsgálati módszert (amely az OECD 430. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) (3) és a B.65. vizsgálati módszert (amely az OECD 435. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) (4). A potenciális bőrirritációs hatás felmérésére pedig elfogadták az *in vitro* B.46. vizsgálati módszert (mely az OECD 439. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) (5). A bőrkorróziós és bőrirritációs vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló OECD-iránymutatás több, információforrásokat és adatelemző eszközöket csoportosító modult ismertet, továbbá iránymutatást nyújt arra nézve, i. hogyan integrálhatók és használhatók az ismert vizsgálati és nem vizsgálati eredetű adatok a vegyi anyagok potenciális bőrirritációs és bőrkorróziós hatásainak felmérésére, és ii. javaslatot tesz egy, a további vizsgálatok szükségessége esetén alkalmazható megközelítésre (6).

3. Ez a vizsgálati módszer a bőrkorrózióval mint az emberi egészség károsodásának egyik végpontjával foglalkozik. A módszerben (nem transzformált emberi epidermális keratinsejtekből felépített) rekonstruált emberi felhámot (RhE) alkalmaznak, amely nagy hasonlósággal modellezi az emberi bőr felső rétegének, azaz a felhámnak (epidermisznek) szövettani, morfológiai, biokémiai és fiziológiai tulajdonságait. A módszerrel egyenértékű, eredetileg 2004-ben elfogadott OECD-iránymutatás 2013-as átdolgozott változatába belefoglalták az RhE-modellt használó további vizsgálati módszereket és annak lehetőségét, hogy a módszereket a korrozív vegyi anyagok alkategóriába sorolására is alkalmazzák, 2015-ös átdolgozott kiadása pedig kitér az IATA-iránymutatásra és bevezet egy, az életképesség mérésére szolgáló alternatív eljárást.

4. E vizsgálati módszer négy validált, kereskedelmi forgalomban kapható RhE-modellt foglal magában. A kereskedelmi forgalomban beszerezhető vizsgálati modellek közül kettőn – az EpiSkin™ alapmodellen (SM) és az EpiDerm™ bőrkorróziós vizsgálaton (SCT) (EPI-200) – elővalidálási vizsgálatokat végeztek (7), majd ezt követően a bőrkorrózió értékelésére szolgáló hivatalos validálási vizsgálatot (8) (9) (10) is elvégezték (11) (12) (a továbbiakban validált referenciamódszerek, VRM-ek néven is hivatkozunk rájuk). E vizsgálatok következtetései vezettek ahhoz az ajánláshoz, hogy a

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

▼M8

fent említett két validált referenciamódszer használható a korrozív (K) és nem korrozív (NK) anyagok szabályozási célú megkülönböztetésére, valamint hogy az EpiSkin™ emellett a korrozív anyagok alkategóriába sorolására is alkalmazható (13) (14) (15). A teljesítményszabványok szerinti validálás alapján két másik kereskedelmi forgalomban kapható *in vitro* bőrkorróziós RhE vizsgálati modell mutatott az EpiDerm™ validált referenciamódszerhez hasonló eredményeket (16) (17) (18). Ez a két modell a SkinEthic™ RHE ([1]) és az epiCS® (korábbi nevén EST-1000), amelyek szintén használhatók a korrozív és nem korrozív anyagok szabályozási célú megkülönböztetésére (19) (20). A rekonstruált emberi felhámmodellek gyártói a validálást követően, 2012 és 2014 között vizsgálatokat végeztek egy továbbfejlesztett protokoll alapján, amely korrigálta a vizsgálati vegyi anyagok nem specifikus MTT-redukáló hatására visszavezethető interferenciákat, javítva ezáltal a modellek teljesítményét mind a korrozív/nem korrozív anyagok megkülönböztetése, mind a korrozív anyagok alkategóriába sorolása terén (21) (22). Az EpiDerm™ SCT, a SkinEthic™ RHE és az EpiCS® validálás utáni alkalmazása során nyert adatok statisztikai elemzése révén olyan alternatív előrejelzési modelleket azonosítottak, amelyek javították az alkategóriába sorolási előrejelző képességet (23).

5. Mielőtt az *in vitro* RhE bőrkorróziós vizsgálati módszerhez hasonló vagy ahhoz képest módosított, a validált referenciamódszerektől eltérő javasolt módszer szabályozási célú alkalmazásra kerülne, a validált referenciamódszerekhez való hasonlóságának biztosítása érdekében az OECD 34. iránymutatásában lefektetett elvekkel (25) összhangban létrehozott teljesítményszabványok (24) követelményeinek megfelelően meg kell határozni a javasolt felhasználása tekintetében fennálló megbízhatóságát, relevanciáját (pontosságát) és korlátait. Az adatok kölcsönös elfogadása csak azután garantált, hogy a javasolt új vagy átdolgozott vizsgálati módszert a teljesítményszabványok szerint felülvizsgálták és belefoglalták a megfelelő vizsgálati iránymutatásba. A vizsgálati iránymutatásban szereplő vizsgálati modellek felhasználhatók az *in vitro* bőrkorróziós vizsgálati módszer vizsgálati eredményeire vonatkozó nemzeti követelmények kialakításához, ugyanakkor biztosítják az adatok kölcsönös elfogadásának előnyeit.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

6. Az alkalmazott fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

7. Ez a vizsgálati módszer lehetővé teszi a nem korrozív és korrozív anyagok és keverékek ENSZ GHS és CLP-rendelet szerinti azonosítását. A vizsgálati módszer emellett támogatja a korrozív anyagok és keverékek nem kötelező jellegű besorolását az ENSZ GHS (1) szerinti 1A alkategóriába, valamint egy kombinált 1B és 1C alkategóriába (21) (22) (23). A vizsgálati módszer egyik korlátja, hogy az 1C alkategóriába sorolt, ismert *in vivo* korrozív vegyi anyagok csekély száma miatt nem teszi lehetővé a bőrkorróziós 1B alkategória és 1C alkategória ENSZ GHS és CLP-rendelet szerinti megkülönböztetését. Az EpiSkin™, az EpiDerm™ SCT, a SkinEthic™ RHE és az epiCS® vizsgálati modellekkel elvégezhető az alkategóriába sorolás (vagyis 1A vagy 1B és 1C vagy nem korrozív (NK)).

8. A vizsgálati módszerben szereplő, a nem korrozív és korrozív anyagok azonosítására alkalmazott, vizsgálati modelleket alátámasztó validálás során igen sokféle, többségében különálló anyagokat képviselő vegyi anyagot vizsgáltak; a validálási vizsgálat empirikus adatbázisa összesen 60 vegyi anyagot tartalmazott, amelyek lefedik a kémiai osztályok széles körét (8) (9) (10). A vizsgálati módszer kidolgozói vizsgálták a módszer alkategóriába sorolásra való

([1]) Az RhE (= rekonstruált emberi felhám) rövidítés az összes RhE-technológián alapuló modell esetében használatos. A SkinEthic™ modellel összefüggésben használt RHE rövidítésnek ugyanaz a jelentése, de mivel az a szóban forgó vizsgálati módszer kereskedelmi nevének része, nagybetűvel írandó.

▼M8

alkalmazásához kapcsolódó érzékenységét, specificitását, pontosságát és laboratóriumon belüli megismételhetőségét, e vizsgálatok eredményét az OECD felülvizsgálta (21) (22) (23). Az összes rendelkezésre álló adat alapján a vizsgálati módszer a legkülönbözőbb kémiai osztályokra és halmazállapotokra, azon belül folyadékokra, félszilárd, szilárd és viaszos állagú anyagokra alkalmazható. A folyadékok lehetnek vizesek vagy nem vizesek; a szilárd anyagok lehetnek vízben oldódóak vagy oldhatatlanok. Ahol megoldható, a szilárd anyagokat alkalmazásuk előtt finom porrá kell őrölni; a mintát előzetesen nem szükséges más módon kezelni. Olyan esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a vizsgálati módszer keretében alkalmazott vizsgálati modellek nem használhatók valamely konkrét vegyianyag-kategóriára, a vizsgálati modelleket nem szabad az adott vegyianyag-kategóriára alkalmazni. E vizsgálati módszerről feltételezhető továbbá, hogy az anyagokra való alkalmazhatóságának kiterjesztéseként keverékekre is alkalmazható. Mivel azonban a keverékek kategóriák és összetételek széles körét fedik le, és jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a keverékek vizsgálatára vonatkozóan, azokban az esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a vizsgálati módszer valamely konkrét keverékkategóriára nem alkalmazható (pl. a (26) szakirodalomban javasolt stratégia alapján), a vizsgálati módszer az adott keverékkategóriára nem alkalmazható. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény. Gázokat és aeroszolokat hitelesítési vizsgálat keretében még nem vizsgáltak (8) (9) (10). Bár elképzelhető, hogy ezek is vizsgálhatók a rekonstruált emberi felhámmodelles technikával, a jelenlegi vizsgálatimódszer-leírás nem engedi meg gázok és aeroszolok vizsgálatát.

9. Azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek ugyanabban a tartományban nyelik el a fényt, mint az MTT-formazán, és azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek közvetlenül is képesek redukálni az MTT vitális festéket (MTT-formazánná), befolyásolhatják a szövet életképességének mérését, ennek korrigálása érdekében adaptált kontrollokra van szükség. Az esetlegesen szükséges adaptált kontrollok típusa függ a vizsgálati vegyi anyag által előidézett interferencia típusától és az MTT-formazán méréséhez használt eljárástól (lásd a 25–31. pontot).

10. Ez a vizsgálati módszer ugyan nem biztosít megfelelő információkat a bőrirritáció felméréséhez, de az RhE vizsgálati rendszeren alapuló B.46. vizsgálati módszer célja kifejezetten az, hogy *in vitro* eljárással határozza meg a bőrirritáció egészségügyi hatását, noha más protokoll alkalmazásával (5). Egyetlen bőrexpozíció után a bőrt ért helyi hatások teljes kiértékeléséhez a vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről szóló OECD-iránymutatást kell tanulmányozni (6). Ezen integrált vizsgálati és értékelési megközelítés szerint *in vitro* bőrkorróziós vizsgálatokat (mint az ebben a vizsgálati módszerben leírtak) és bőrirritációs vizsgálatokat kell lefolytatni mielőtt az élő állatokon végzett vizsgálatokat fontolóra lehetne venni. Elfogadott tény, hogy az emberi bőr használatára nemzeti és nemzetközi etikai megfontolások és feltételek vonatkoznak.

A VIZSGÁLAT ELVE

11. A vizsgálati vegyi anyagot egy olyan nem transzformált emberi epidermális keratinocitákat tartalmazó, háromdimenziós rekonstruált emberi felhámmodellre viszik fel topikálisan, amelyeket úgy tenyésztettek ki, hogy többrétegű, erősen differenciált emberi felhámot (epidermiszt) alkossanak. Ez szervezett bazális, spinózus és granuláris sejtrétegekből, valamint intercelluláris lamelláris lipidrétegeket tartalmazó többrétegű szarurétegből (*stratum corneum*) áll, amely tartalmazza a fő lipid osztályokat, amelyek analógok az *in vivo* megtalálhatókkal.

▼M8

12. Az RhE vizsgálati módszer azon az előfeltételen alapul, hogy a korrozív vegyi anyagok diffúzióval vagy erózióval képesek áthatolni a *stratum corneum*on, és az alatta lévő sejtrétegekre citotoxikus hatást gyakorolnak. A sejtek életképességét az MTT [3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid, tiazolil kék tetrazólium-bromid; CAS-száma: 298–93–1)] vitális festék enzimatikus úton kék formazán kristállyá történő átalakulása alapján mérik, amelyet a szövetekből történő kivonás után mennyiségileg meghatároznak (27). A korrozív hatású vegyi anyagokat azon képességük alapján azonosítják, hogy a sejtek életképességét meghatározott határérték alá csökkentik (lásd a 35. és a 36. pontot). Az RhE-alapú bőrkorróziós vizsgálati módszerről kimutatták, hogy képes előrejelezni a B.4. vizsgálati módszer (2) alapján nyulakon meghatározott *in vivo* bőrkorróziós hatásokat.

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

13. Az e vizsgálati módszerhez kapcsolódó négy validált RhE vizsgálati modell rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak a 1. táblázatban felsorolt tizenkét jártassági tesztanyag megfelelő besorolásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Valamely módszer alkategóriába sorolás céljára történő használta esetén bizonyítani kell az alkategóriák megfelelő meghatározásában való jártasságot is. Ha a jegyzékben szereplő valamely anyag nem áll rendelkezésre, illetve ha indokolható, megfelelő *in vivo* és *in vitro* referenciaadatokkal rendelkező más – például a referencia-vegyianyagok jegyzékében feltüntetett (24) – anyag is használható, amennyiben a kiválasztási kritériumok megegyeznek az 1. táblázatban foglaltakkal.

1. táblázat

A jártassági tesztanyagok jegyzéke ([1])

Anyag	CAS-szám	Kémiai osztály ([2])	ENSZ GHS/CLP szerinti, *in vivo* eredményeken alapuló kat. ([3])	VRM szerinti, *in vitro* eredményeken alapuló kat. ([4])	MTT-redukáló ([5])	Halmaz-állapot
1A alkategóriájú *in vivo* korrozív anyagok						
Brómecetsav	79-08-3	Szerves sav	1A	(3) 1A	—	Sz
Bór-trifluorid-dihidrát	13319-75-0	Szervetlen sav	1A	(3) 1A	—	F
Fenol	108-95-2	Fenol	1A	(3) 1A	—	Sz
Diklór-acetil-klorid	79-36-7	Elektrofil	1A	(3) 1A	—	F
Kombinált 1B–1C alkategóriájú *in vivo* korrozív anyagok						
Glioxilsav-monohidrát	563-96-2	Szerves sav	1B–1C	(3) 1B–1C	—	Sz
Tejsav	598-82-3	Szerves sav	1B–1C	(3) 1B–1C	—	F
Etanolamin	141-43-5	Szerves bázis	1B	(3) 1B–1C	I	Viszkózus

▼M8

Anyag	CAS-szám	Kémiai osztály ([2])	ENSZ GHS/CLP szerinti, *in vivo* eredményeken alapuló kat. ([3])	VRM szerinti, *in vitro* eredményeken alapuló kat. ([4])	MTT-redukáló ([5])	Halmaz-állapot
1A alkategóriájú *in vivo* korrozív anyagok						
Sósav (14,4 %)	7647-01-0	Szervetlen sav	1B–1C	(3) 1B–1C	—	F
In vivo Nem korrozív anyagok						
Fenetil-bromid	103-63-9	Elektrofil	NK	(3) NK	I	F
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Szerves bázis	NK	(3) NK	—	Sz
4-(metil-tio)-benzaldehid	3446-89-7	Elektrofil	NK	(3) NK	I	F
Laurinsav	143-07-7	Szerves sav	NK	(3) NK	—	Sz

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; VRM = Validált referenciamódszer; NK = Nem korrozív; I = Igen; Sz = szilárd; F = folyékony

([1]) A jártassági tesztanyagok – amelyek felsorolása elsőként korrozív és nem korrozív hatásuk szerint, majd korrozivitási alkategóriák szempontjából, végül pedig kémiai osztályuk alapján történt – az ECVAM által az EpiSkin™ és az EpiDerm™ modellről készített validálási vizsgálatokban használt anyagok közül (8) (9) (10), valamint az EpiSkin™ (22), az EpiDerm™, a SkinEthic™ és az epiCS® előállítói által rendelkezésre bocsátott adatok alapján végzett validálás utáni vizsgálatokból (23) kerültek kiválasztásra. Ha nincs másképpen feltüntetve, az anyagokat a kereskedelmi forrásból való beszerzésükkor tapasztalt tisztasági szinten vizsgálták (8) (10). A lehetőségekhez mérten olyan anyagok kerülnek kiválasztásra, amelyek: i. a validált referenciamódszerek által mérhető vagy előrevetíthető korrozivitási válaszreakciók tartományának tekintetében reprezentatívak (pl. nincs korrozív hatásuk; enyhétől az erősig terjedő korróziós hatást váltanak ki); ii. a validálási vizsgálatokban használt kémiai osztályok tekintetében reprezentatívak; iii. jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek; iv. megismételhető eredményeket váltanak ki a validált referenciamódszerben; v. egyértelmű eredményeket hoznak az *in vivo* referencia vizsgálati módszer alkalmazásakor; vi. kereskedelmi forgalomban kaphatók; és vii. nem kapcsolódnak hozzájuk kiemelkedően magas ártalmatlanítási költségek.

([2]) A Barratt és társai szerinti kémiai osztály (8).

([3]) Az ENSZ GHS/CLP-rendelet szerinti 1A, 1B és 1C kategóriának az ENSZ I., II. és III. csomagolási csoportja felel meg.

([4]) A validált referenciamódszer táblázatban szereplő *in vitro* előrejelzései a vizsgálati módszer kidolgozói által az EpiSkin™ és az EpiDerm™ vizsgálati modellekkel végzett, validálást követő vizsgálatokból származnak.

([5]) Az ECVAM bőrkorróziós validálási vizsgálataiból származó életképességi értékek esetében nem korrigálták a közvetlen MTT-redukáló hatást (a validálási vizsgálatok során nem végeztek kontrollt elhalt szöveteken). Viszont a táblázatban feltüntetett, a vizsgálati módszer kidolgozóitól származó validálás utáni adatokat adaptált kontrollvizsgálatok alkalmazásával nyerték (23).

14. A jártasság igazolásának részeként ajánlott, hogy a felhasználó a rekonstruált emberi felhámmodell előállítója által meghatározottak szerint, átvétel után ellenőrizze a szövetek barrierjellemzőit. Ez különösen fontos, ha a szöveteket nagy távolságra/hosszú ideig szállították. Ha egy vizsgálati módszert már sikeresen igazoltak, és az alkalmazásában való jártasságot bizonyították, ilyen jellegű ellenőrzéseket nem szükséges rutinszerűen végezni. Ha azonban egy vizsgálati módszert rutinszerűen alkalmaznak, a barrierjellemzőket javasolt továbbra is rendszeres időközönként ellenőrizni.

ELJÁRÁS

15. Az alábbiak általános leírását adják a vizsgálati módszer keretében alkalmazott, a bőrkorrózió felmérésére szolgáló RhE vizsgálati modellek összetevőinek és eljárásainak. Azok a rekonstruált emberi felhámmodellek, amelyeknek e vizsgálati módszer keretében történő használatát tudományosan megalapozottként elfogadták – vagyis az EpiSkin™ (SM), az EpiDerm™ (EPI-200), a SkinEthic™ RHE és az epiCS® modellek (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33) – kereskedelmi forgalomban beszerezhetők. E négy rekonstruált emberi felhámmodellhez rendelkezésre állnak szabványműveleti eljárások (34) (35) (36) (37), vizsgálati módszerük főbb összetevőit pedig a 2. melléklet foglalja össze. E modellek bármelyikének

▼M8

laboratóriumi kivitelezése és alkalmazása során tanácsos tanulmányozni a vonatkozó szabványműveleti eljárást. Az ehhez a vizsgálati módszerhez tartozó négy rekonstruált emberi felhámmodellel végzett vizsgálatoknak az alábbi feltételeknek kell megfelelniük:

A RHE VIZSGÁLATI MÓDSZER ÖSSZETEVŐI

Általános feltételek

16. Az epitélium felépítéséhez nem transzformált emberi keratinocita sejteket kell használni. Élő epitélsejtek több rétegének (bazális réteg, *stratum spinosum, stratum granulosum*) kell jelen lennie a funkcionális *stratum corneum* alatt. A *stratum corneum*nak többrétegűnek kell lennie, és tartalmaznia kell az elengedhetetlenül szükséges lipidprofilt, hogy nagy ellenálló képességgel rendelkező funkcionális barriert képezzen a citotoxikus referencia-vegyianyagok, pl. a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) vagy a Triton X-100 gyors áthatolása ellen. A barrierfunkciót bizonyítani kell, ennek értékeléséhez meghatározható az a referencia-vegyianyag koncentráció, amely meghatározott idejű expozíciót követően 50 %-kal csökkenti a szövetek életképességét (IC_{50}), vagy az az expozíciós idő, amely alatt egy adott, állandó koncentrációjú referencia-vegyianyag hatására a sejtek életképessége 50 %-kal csökken (ET_{50}) (lásd a 18. pontot). A rekonstruált emberi felhámmodell folyadékzáró tulajdonságainak meg kell akadályozni, hogy az anyag passzáljon a *stratum corneum* körül az élő szövetbe, amely a bőr expozíciójának rossz modellezését eredményezné. A rekonstruált emberi felhámmodellnek baktérium-, vírus-, mikoplazma- és gombafertőzéstől mentesnek kell lennie.

Funkcionális feltételek

Életképesség

17. A szövetek életképességének számszerű mérése MTT-vizsgálattal történik (27). A rekonstruált emberi felhám szövetkonstrukciójának élő sejtjei az MTT vitális festéket kék MTT-formazán kicsapódássá redukálják, amelyet azután izopropanol (vagy hasonló oldószer) használatával kivonnak a szövetből. Az extraháló oldószer optikai sűrűségének (OD) eléggé alacsonynak, azaz 0,1 alattinak kell lennie. A kivont MTT-formazán mennyisége meghatározható hagyományos abszorbancia (OD) méréssel vagy HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással (38). A rekonstruált emberi felhámmodell felhasználóinak biztosítaniuk kell, hogy az alkalmazott RhE-modell minden egyes tétele megfeleljen a negatív kontrollra vonatkozóan meghatározott kritériumoknak. A rekonstruált emberi felhámmodell előállítójának/forgalmazójának meg kell határoznia a negatív kontroll OD-értékének elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékét). A vizsgálati módszerhez kapcsolódó négy validált RhE vizsgálati modell negatív kontrolljának OD-értékére vonatkozó elfogadhatósági tartományokat a 2. táblázat tartalmazza. Az HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárást használóknak a negatív kontroll elfogadhatósági kritériumaként a 2. táblázatban szereplő negatív kontrollra vonatkozó OD-tartományok szolgálnak. Dokumentálni kell, hogy a negatív kontrollal kezelt szövetek az expozíció időtartama alatt stabil tenyészetben vannak (hasonló OD-értékeket adnak).

2. táblázat

A negatív kontroll OD-értékének elfogadhatósági tartománya a tétel minőségének ellenőrzéséhez

	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
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

Barrierfunkció

18. A *stratum corneum*nak és lipidprofiljának az IC_{50} vagy ET_{50} alapján végzett becslések szerint (3. táblázat) megfelelő ellenálló képességgel kell rendelkeznie ahhoz, hogy meg tudja akadályozni bizonyos citotoxikus referencia-vegyianyagok (pl. a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) vagy a Triton X-100) gyors áthatolását. Az RhE-modell előállítójának/forgalmazójának, a szövetek végfelhasználóhoz történő kiszállításakor igazolnia kell az alkalmazott rekonstruált emberi felhámmodell minden egyes tételének barrierfunkcióját (lásd a 21. pontot).

Morfológia

19. A rekonstruált emberi felhámmodellen szövettani vizsgálatot kell végezni, amely igazolja a többrétegű – bazális, spinózus és granuláris sejtrétegekből (*stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum*) és szarurétegből (*stratum corneum*) álló – humán epidermiszszerű szerkezetet, valamint azt, hogy a modell lipidprofilja hasonlatos az emberi felhám lipidprofiljához. Az RhE-modell előállítójának/forgalmazójának, a szövetek végfelhasználóhoz történő eljuttatásakor az alkalmazott rekonstruált emberi felhámmodell minden tételén szövettani vizsgálattal igazolnia kell a szövetek megfelelő morfológiáját (lásd a 21. pontot).

Reprodukálhatóság

20. A vizsgálati módszer felhasználóinak pozitív és negatív kontrollokkal igazolniuk kell a vizsgálati módszerek időbeli reprodukálhatóságát. Emellett a vizsgálati módszer kizárólag alkalmazható, ha az RhE-modell előállítója/forgalmazója adatokkal támasztja alá, hogy a módszer – pl. a jártassági tesztanyagok jegyzékében (1. táblázat) szereplő – korrozív és nem korrozív vegyi anyagokkal időben megismételhető. Valamely vizsgálati módszer alkategóriába sorolás céljára történő alkalmazása esetén a megismételhetőséget az alkategóriába sorolás tekintetében is bizonyítani kell.

Minőség-ellenőrzés

21. A rekonstruált emberi felhámmodell csak abban az esetben alkalmazható, ha előállítója/forgalmazója igazolja, hogy az alkalmazott RhE-modell minden egyes tétele megfelel a gyártás utáni felszabadításra vonatkozóan meghatározott feltételeknek, amelyek közül az életképességre (17. pont), a barrierfunkcióra (18. pont) és a morfológiára (19. pont) vonatkozó kritériumok a leglényegesebbek. Ezeket az adatokat a vizsgálati módszer felhasználóinak rendelkezésére kell bocsátani, hogy ezeket az információkat fel tudják tüntetni a vizsgálati jelentésben. A korrozív hatás besorolásának megbízható előrejelzéseként kizárólag minőség-ellenőrzésen elfogadott szövetteleken végzett vizsgálatok eredményei fogadhatók el. Az IC50 és az ET50 eljárás elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékét) a rekonstruált emberi felhámmodell előállítójának/forgalmazójának kell meghatároznia. A négy validált vizsgálati modell elfogadhatósági tartományát a 3. táblázat ismerteti.

3. táblázat

Minőség-ellenőrzési tételfelszabadítás feltételei

	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiSkin™ (SM) (18 órás kezelés nátrium-dodecil-szulfáttal (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 óra	ET50 = 8,7 óra
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET50 = 4,0 óra	ET50 = 10,0 óra
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET50 = 2,0 óra	ET50 = 7,0 óra

▼M8

A vizsgálati vegyi anyag és a kontrollként szolgáló vegyi anyagok alkalmazása

22. Minden expozíciós időszak során valamennyi vizsgálati vegyi anyaghoz és kontrollhoz legalább két szövetreplikátumot kell használni. Folyékony és szilárd vegyi anyagok esetében egyaránt megfelelő mennyiségű vizsgálati vegyi anyagot kell alkalmazni, hogy az egyenletesen fedje az epidermisz felszínét, azaz minimum 70 µl/cm^2 vagy 30 mg/cm^2-t, ugyanakkor el kell kerülni a végtelen dózis alkalmazását. Modelltől függően szilárd vegyi anyagok alkalmazása előtt az epidermisz felületét ionmentesített vagy desztillált vízzel be kell nedvesíteni, hogy jobb legyen az érintkezés a vizsgálati vegyi anyag és az epidermisz felszíne között (34) (35) (36) (37). A szilárd anyagokat, amikor csak lehetséges finom por alakban kell vizsgálni. A felvitel módjának meg kell felelnie a vizsgálati vegyi anyagnak (lásd például a 34–37. referenciát). Az expozíciós időszak lejártával a vizsgálati vegyi anyagot vizes alapú pufferrel vagy 0,9 %-os NaCl-dal óvatosan le kell mosni az epidermisz felületéről. Attól függően, hogy a négy validált RhE vizsgálati modell közül melyiket használják, vizsgálati vegyi anyagonként két vagy három expozíciós időszak alkalmazandó (mind a négy validált rekonstruált emberi felhámmodell esetében: 3 perc és 1 óra; az EpiSkin™ esetében plusz egy 4 órás expozíciós időszak). Az alkalmazott RhE vizsgálati modell és a meghatározott expozíciós időszak függvényében az expozíció alatti inkubációs hőmérséklet szobahőmérséklet és 37 °C között változhat.

23. Minden vizsgálatmenetben párhuzamos negatív és pozitív kontrollokkal bizonyítani kell, hogy a szövetek életképessége (negatív kontrollokkal), barrierfunkciója és az abból fakadó érzékenysége (pozitív kontrollokkal) egy meghatározott dokumentált elfogadhatósági tartományba esik. A javasolt pozitív kontrollanyag az alkalmazott rekonstruált emberi felhámmodelltől függően a jégecet vagy a 8N KOH. Megjegyzendő, hogy a 8N KOH közvetlen MTT-redukáló hatású, ezért szükség lehet a 25. és 26. pontban ismertetett adaptált kontrollok elvégzésére. A javasolt negatív kontrollanyag a 0,9 vegyesszázalékos NaCl-oldat vagy a víz.

A sejtek életképességének mérése

24. E vizsgálati módszer alkalmazása során a sejtek életképességének mérésére a kvantitatív MTT-vizsgálatot kell alkalmazni (27). A szövetmintát 3 órára megfelelő koncentrációjú (0,3 vagy 1 mg/ml) MTT-oldatba helyezik. A kicsapódott kék formazán terméket azután oldószer (pl. izopropanol, savas izopropanol) használatával eltávolítják a szövetből, és egy maximum ±30 nm-es sávszűrő alkalmazásával 570 nm hullámhosszon az OD-érték meghatározásával, vagy egy HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján (lásd a 30. és 31. pontot) (38) megmérik a formazán koncentrációját.

25. A vizsgálati vegyi anyagok megzavarhatják az MTT-vizsgálatot azáltal, hogy közvetlenül kék formazánná redukálják az MTT-t és/vagy azáltal, hogy színinterferenciát okoznak, ha a vizsgálati vegyi anyag jellegénél fogva vagy a kezelési eljárás következtében a formazánnal azonos OD-tartományban nyeli el a fényt (570 ± 30 nm, többnyire kék vagy lila vegyi anyagok esetében). E vizsgálati vegyi anyagok potenciális zavaró hatásának kiszűrése és korrigálása érdekében további kontrollokat kell végezni, mint például a nem specifikus MTT-redukció (NSMTT) kontrollt és a nem specifikus színeződés (NSC) kontrollt (lásd a 26–30. pontot). Ez különösen fontos abban az esetben, amikor egy adott vizsgálati vegyi anyagot nem távolítottak el teljesen a szövetből a mosás során, vagy amikor az anyag áthatol az epidermiszen, és így az MTT életképességi vizsgálat elvégzése során jelen van a szövetekben. A vizsgálati modellek szabványműveleti eljárásai részletes leírással szolgálnak arról, hogyan kell korrigálni a közvetlen MTT-redukáló hatást és a színezőanyagok okozta zavaró hatást (34) (35) (36) (37).

▼M8

26. A közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező anyagok azonosítása érdekében minden vizsgálati vegyi anyagot frissen készített MTT-közegbe kell helyezni (34) (35) (36) (37). Amennyiben a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó MTT-keverék színe kékre/lilára változik, a vizsgálati vegyi anyag feltételezhetően közvetlenül redukálja az MTT-t, ezért kiegészítő funkcionális ellenőrzést kell végezni elhalt epidermiszen, független vizsgálat keretében hagyományos abszorbancia (OD) mérés, illetve HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján. E kiegészítő funkcionális ellenőrzés során elhalt szöveteket használnak, amelyek reziduális metabolikus aktivitással rendelkeznek csupán, ugyanakkor a vizsgálati vegyi anyagot az élő szövetekhez hasonló mértékben abszorbeálják. Az egyes MTT-redukáló hatású vegyi anyagokkal expozíciós időszakonként legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes bőrkorróziós vizsgálatot. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez az MTT-redukáló anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból levonják az ugyanazon MTT-redukáló anyaggal kezelt elhalt szövetekkel kapott nem specifikus MTT-redukció arányát, amelyet a vizsgálattal párhuzamosan végzett negatív kontrollal korrigálva számítanak ki (NSMTT-arány).

27. Annak érdekében, hogy meghatározható legyen a színes vizsgálati vegyi anyagok, illetve a vízzel vagy izopropanollal való érintkezés következtében elszíneződött vizsgálati vegyi anyagok potenciális zavaró hatása, és dönteni lehessen a kiegészítő kontrollok szükségességéről, el kell végezni a vizsgálati vegyi anyag spektrumelemzését vízben (expozíciós környezet) és/vagy izopropanolban (extraháló oldat). Amennyiben vízben és/vagy izopropanolban a vizsgálati vegyi anyag 570 ± 30 nm-es tartományban nyeli el a fényt, további színezőanyag-kontrollokra van szükség, illetve alternatív megoldásként HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárást lehet végezni, amelynek alkalmazásakor ezek a kontrollok nem szükségesek (lásd a 30. és 31. pontot). Hagyományos abszorbancia (OD) mérés esetén az egyes zavaró hatású színes vizsgálati vegyi anyagokkal expozíciós időszakonként legalább két élő szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes bőrkorróziós vizsgálatot, de az MTT inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat, hogy létrehozzanak egy nem specifikus színeződés ($NSC_{élő}$) kontrollt. Az élő szövetekre jellemző biológiai változékonyságból kifolyólag az $NSC_{élő}$ kontrollt (minden egyes vizsgálatmenetben) valamennyi expozíciós időszakkal és színes vizsgálati vegyi anyaggal párhuzamosan el kell végezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT-oldatban inkubált élő szövetekkel kapott életképességi arányból levonják a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan elvégzett, a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt, viszont MTT nélküli közegben inkubált élő szövetekkel kapott nem specifikus elszíneződési százalékot ($NSC_{élő}$ arány).

28. Azon hagyományos abszorbancia (OD) méréssel értékelt vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek egyaránt okoznak közvetlen MTT-redukciót (lásd a 26. pontot) és színinterferenciát (lásd a 27. pontot), az előző pontokban ismertetett NSMTT és $NSC_{élő}$ kontrollok mellett szükség van egy harmadik fajta kontrollra is. Általában ez a helyzet áll elő az MTT-vizsgálatot zavaró sötét színű (pl. kék, lila, fekete) vizsgálati vegyi anyagoknál, mivel saját színük akadályozza, hogy a 26. pontban leírtak szerint értékelni lehessen közvetlen MTT-redukáló hatásukat. Ezek a vizsgálati vegyi anyagok egyaránt kötődhetnek élő és elhalt szövetekhez, ezért az NSMTT-kontroll nem csupán a vizsgálati vegyi anyag által előidézett közvetlen MTT-redukáló hatást korrigálja, hanem az anyag elhalt szövetekhez való kötődéséből eredő színinterferenciát is. Ez viszont a színinterferencia kétszeri korrekciójához vezethet, mivel az $NSC_{élő}$ kontroll már korrigálja a vizsgálati vegyi anyag élő szövetekhez való kötődéséből fakadó színinterferenciát. A színinterferencia esetleges kétszeri korrekciójának kiküszöbölése érdekében szükség van egy harmadik kontrollra, amely az elhalt szövetek esetében méri a nem specifikus elszíneződést (NSC_{elhalt}). E kiegészítő kontroll során a vizsgálati vegyi anyaggal expozíciós időszakonként legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes bőrkorróziós vizsgálatot, de az MTT inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat. A független vizsgálatok/vizsgálatmenetek számától

▼**M8**

függetlenül vizsgálati vegyi anyagonként elegendő egyetlen NSC_{elhalt} kontroll, azt azonban az NSMTT-kontrollal egyidejűleg, és ha megoldható, ugyanazon szövettételen kell elvégezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból levonják az NSMTT-arányt és az $NSC_{élő}$ arányát, majd hozzáadják a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT nélküli közegben inkubált elhalt szövetekkel kapott nem specifikus elszíneződési arányt, amelyet a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan végzett negatív kontrollhoz viszonyítva számítanak ki (NSC_{elhalt} arány).

29. Fontos megjegyezni, hogy a nem specifikus MTT-redukció és a nem specifikus színinterferencia a spektrofotométer linearitási tartománya fölé növelheti a szövetkivonat leolvasott értékeit. Ebből kifolyólag minden laboratóriumnak kereskedelmi forgalomban kapható MTT-formazán (CAS-száma: 57360-69-7) segítségével meg kell határoznia spektrofotométerének linearitási tartományát, mielőtt megkezdené a vizsgálati vegyi anyagok szabályozási célú vizsgálatát. A spektrofotométert használó hagyományos abszorbancia (OD) mérés alkalmas a közvetlen MTT-redukáló hatással bíró és színinterferenciát okozó vizsgálati vegyi anyagok értékelésére, amikor a szövetkivonatok vizsgálati vegyi anyaggal kapott, közvetlen MTT-redukció és/vagy színinterferencia tekintetében nem korrigált OD-értékei a spektrofotométer linearitási tartományán belül vannak, illetve amikor a vizsgálati vegyi anyaggal kapott nem korrigált életképességi arány alapján a vizsgálati vegyi anyag korrozívnak tekinthető (lásd a 35. és 36. pontot). Mindazonáltal a negatív kontroll 50 %-ánál nagyobb NSMTT-arányt és/vagy $NSC_{élő}$ arányt előidéző vizsgálati vegyi anyagok eredményei óvatosan értelmezendők.

30. Azon színes vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek nagy mértékben befolyásolják az MTT-vizsgálatot, és ezért hagyományos abszorbancia (OD) méréssel nem vizsgálhatók, az MTT-formazán HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással történő meghatározását lehet alkalmazni (lásd a 31. pontot) (37). A HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer lehetővé teszi, hogy az MTT-formazánt mennyiségi meghatározása előtt elkülönítsék a vizsgálati vegyi anyagtól (38). Ezért HPLC/UPLC spektrofotometriás módszer használata esetén a vizsgálati vegyi anyagtól függetlenül soha nincs szükség $NSC_{élő}$ és NSC_{elhalt} kontrollra. Az NSMTT-kontroll ugyanakkor alkalmazandó, ha a vizsgálati vegyi anyag gyaníthatóan közvetlenül redukálja az MTT-t, vagy a színe miatt közvetlen MTT-redukáló hatását nem lehet felmérni (a 26. pontban ismertetett módon). Amennyiben HPLC/UPLC spektrofotometriásan mérik az MTT-formazánt, a szövetek életképességi aránya a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott MTT-formazán csúcsterület és a párhuzamos negatív kontrollal kapott MTT-formazán csúcsterület aránya lesz. A közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező vizsgálati vegyi anyagok esetében a szövetek valódi életképességét úgy számítják ki, hogy a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból kivonják az NSMTT-arányt. Végül megjegyzendő, hogy azok a közvetlen MTT-redukáló hatású, esetleg színinterferenciát is okozó vegyi anyagok, amelyek a kezelést követően visszamaradnak a szövetben és olyan erős MTT-redukáló hatással bírnak, hogy a vizsgált szövetkivonatok OD-értéke (hagyományos OD mérés esetén), illetve csúcsterülete (HPLC/UPLC spektrofotometriás mérés esetén) kívül esik a spektrofotométer linearitási tartományán, nem értékelhetők, bár ilyen csak igen ritka esetben fordul elő.

▼M8

31. A HPLC/UPLC spektrofotometria bármely típusú vizsgálati vegyi anyagnál (színes, nem színes, MTT-redukáló vagy nem MTT redukáló hatású) alkalmazható az MTT-formazán mérésére (38). A HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszerek sokfélesége miatt szükség van arra, hogy a szövetkivonatok MTT-formazán-tartalmának meghatározása előtt igazolják a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítését azzal, hogy eleget tesznek az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelete (FDA) által az iparág számára kiadott, bioanalitikus módszerek validálására vonatkozó iránymutatásban (38) (39) szereplő standard minősítési paramétereken alapuló elfogadhatósági kritériumoknak. E kulcsfontosságú paraméterekről és elfogadhatósági kritériumokról a 4. függelék nyújt tájékoztatást. Amint eleget tettek a 4. függelékben meghatározott elfogadhatósági kritériumoknak, a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítettnek tekintendő, és alkalmas arra, hogy az itt leírt vizsgálati módszerben bemutatott kísérleti feltételek mellett elvégezze az MTT-formazán mérését.

Elfogadhatósági kritériumok

32. Minden vizsgálati módszer esetében, amelynek során érvényes RhE-modelleket alkalmaznak, a negatív kontrollal kezelt szöveteknek olyan OD-értéket kell mutatniuk, amely tükrözi a szövetek 2. táblázatban feltüntetett értékek szerinti minőségét, és amely nem lehet alacsonyabb a korábbi adatok alapján megállapított határértékeknél. A pozitív kontrollanyaggal, vagyis jégecettel vagy 8N KOH-hal kezelt szöveteknek tükrözniük kell a szövetek azon képességét, hogy a vizsgálati modell feltételei mellett reagálnak a korrozív vegyi anyagokra (lásd a 2. függeléket). A vizsgáltati és/vagy kontroll vegyi anyagokkal kezelt szövetreplikátumok variabilitásának az egyes érvényes RhE-modellek követelményeiben szereplő elfogadott határértéken belül kell maradnia (lásd a 2. függeléket) (*pl.* a két szövetreplikátum közötti variabilitási különbség nem haladhatja meg a 30 %-ot). Amennyiben egy adott vizsgálatmenet negatív vagy pozitív kontrollja kívül esik az elfogadott tartományon, a vizsgálatmenetet érvénytelennek kell nyilvánítani, és meg kell ismételni. Ha a vizsgálati vegyi anyag variabilitása kívül esik a meghatározott tartományon, meg kell ismételni a vizsgálatát.

Az eredmények értelmezése és az előrejelzési modell

33. Az egyes vizsgálati vegyi anyagokra vonatkozó OD-értéket kell felhasználni a 100 %-nak vett negatív kontrollhoz viszonyított százalékos életképesség kiszámításához. HPLC/UPLC spektrofotometria alkalmazása esetén a szövetek életképességi aránya a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott MTT-formazán csúcsterület és a párhuzamos negatív kontrollal kapott MTT-formazán csúcsterület arányaként kerül meghatározásra. A sejtéletképesség százalékban megállapított határértéke, amelynek alapján megkülönböztethetők a korrozív és nem korrozív vizsgálati vegyi anyagok (vagy a különböző korrozív alkategóriák), és amelynek alapján az eredményeket értelmezni kell, a vizsgálati módszerhez tartozó vizsgálati modellekre vonatkozólag az alábbi 35. és 36. pontban kerül meghatározásra.

34. Ha a létrejött besorolás egyértelmű, legalább két szövetreplikátum vizsgálatából álló egyszeri vizsgálatmenetnek elegendőnek kell lennie az adott vizsgálati vegyi anyag esetében. Határértéken lévő eredmények esetében azonban, ha például az egyes szövetreplikátumok eredményei nem egyeznek, megfontolható egy második vizsgálatmenet lefolytatása, és ha az első és a második vizsgálatmenet eredményei különbözőek, egy harmadiké is.

35. Az ENSZ GHS/CLP-rendelet osztályozási rendszeréhez kapcsolódó EpiSkin™ bőrkorróziós vizsgálati modell előrejelzési modellje (9) (34) (22) a 4. táblázat szerint alakul:

▼M8

4. táblázat

EpiSkin™ előrejelzési modell

Adott expozíciós időpontokban mért életképesség (t = 3, 60 és 240 perc)	Megfontolandó javaslat
< 35 % 3 perc expozíció után	**Korrozív:** • Opcionális 1A alkategóra (*)
≥ 35 % 3 perc expozíció után **ÉS** < 35 % 60 perc expozíció után **VAGY** ≥ 35 % 60 perc expozíció után **ÉS** < 35 % 240 perc expozíció után	**Korrozív:** • Opcionális 1B és 1C alkategória kombinációja
≥ 35 % 240 perc expozíció után	**Nem korrozív**

(*) Az RhE vizsgálati modellek alkategóriába sorolásra való alkalmasságának felmérése során nyert adatok azt mutatták, hogy az EpiSkin™ vizsgálati modell használatával az 1A alkategóriába sorolt anyagok mintegy 22 %-a valójában az 1B alkategóriába vagy az anyagok/keverékek 1C alkategóriájába tartozna (vagyis felülkategorizálás történt) (lásd a 3. függeléket).

36. Az ENSZ GHS/CLP-rendelet osztályozási rendszeréhez kapcsolódó EpiDerm™ SCT (10) (23)(35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) és epiCS® (16) (23) (37) bőrkorróziós vizsgálati modellek előrejelzési modellje az 5. táblázat szerint alakul:

5. táblázat

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE és epiCS®

Adott expozíciós időpontokban mért életképesség (t = 3 és 60 perc)	Megfontolandó javaslat
1. LÉPÉS EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE és epiCS® használata esetén	
< 50 % 3 perc expozíció után	**Korrozív**
≥ 50 % 3 perc expozíció után **ÉS** < 15 % 60 perc expozíció után	**Korrozív**
≥ 50 % 3 perc expozíció után **ÉS** ≥ 15 % 60 perc expozíció után	**Nem korrozív**
2. LÉPÉS EpiDerm™ SCT használata esetén – az 1. lépésben korrozívnak minősített anyagoknál/keverékeknél	
< 25 % 3 perc expozíció után	Opcionális 1A alkategóra *
≥ 25 % 3 perc expozíció után	Opcionális kombinált 1B–1C alkategória
2. LÉPÉS SkinEthic™ RHE használata esetén – az 1. lépésben korrozívnak minősített anyagoknál/keverékeknél	
< 18 % 3 perc expozíció után	Opcionális 1A alkategóra *

▼M8

Adott expozíciós időpontokban mért életképesség (t = 3 és 60 perc)	Megfontolandó javaslat
1. LÉPÉS EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE és epiCS® használata esetén	
≥ 18 % 3 perc expozíció után	Opcionális kombinált 1B–1C alkategória
2. LÉPÉS epiCS® használata esetén – az 1. lépésben korrozívnak minősített anyagoknál/keverékeknél	
< 15 % 3 perc expozíció után	Opcionális 1A alkategóra *
≥ 15 % 3 perc expozíció után	Opcionális kombinált 1B–1C alkategória

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

37. Mindegyik vizsgálatra vonatkozóan táblázatos jelentést kell készíteni az egyes szövetreplikátumok adatairól (például OD-értékek és számított százalékos sejt-életképességi adatok az egyes vizsgálati vegyi anyagok esetében, a besorolást is beleértve), amelyben szerepelnie kell a megismételt kísérletek adatainak is, ha voltak ilyenek. Ezen túlmenően jelentésbe kell foglalni az egyes vizsgálatokban használt szövetreplikátumok átlagát, életképességi tartományát és variációs koefficiensét. Az MTT-reagens és a közvetlen MTT-redukáló hatású vagy színes vizsgálati vegyi anyagok között megfigyelt kölcsönhatásokat a jelentésben minden vizsgálati vegyi anyag esetében fel kell tüntetni.

Vizsgálati jelentés

38. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag és kontrollként szolgáló vegyi anyagok:

— Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;

— Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek: amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai jellemzik;

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— eredet, gyártási szám, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag/kontrollanyag kezelése a vizsgálatot megelőzően, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, felhasználási határideje vagy ismételt elemzésének napja, ha ismert;

— tárolási feltételek.

Az alkalmazott RhE-modell és protokoll, valamint használatuk indokolása (amennyiben szükséges)

Vizsgálati körülmények:

— az alkalmazott RhE-modell (és gyártási szám);

▼**M8**

— az MTT-formazán mennyiségi meghatározására használt mérőeszköz (*pl.* spektrofotométer) kalibrálási adatai, a hullámhossz és (adott esetben) a sávszélesség, valamint a mérőeszköz linearitási tartománya;

— az MTT-formazán számszerű mérésére alkalmazott módszer leírása;

— a HPLC/UPLC-spektrofotometriás rendszer minősítésének leírása, ha releváns;

— az alkalmazott specifikus RhE-modellre vonatkozó teljes körű alátámasztó adatok, köztük a modell teljesítménye. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia:

i. életképesség;

ii. barrierfunkció;

iii. morfológia;

iv. reprodukálhatóság és előrejelző képesség;

v. a modell minőség-ellenőrzése;

— hivatkozás a modellel kapott korábbi adatokra. Ennek többek között magában kell foglalnia a minőség-ellenőrzési adatok elfogadhatóságát, tekintettel a korábbi tételadatokra;

— a vizsgálati módszer végrehajtásában való jártasság bizonyítása a módszer rutinszerű használata előtt, a jártassági tesztanyagok vizsgálata révén.

Vizsgálati eljárás:

— az alkalmazott vizsgálati eljárás részletes leírása (ideértve az expozíciós időszak utáni öblítési eljárásokat);

— a vizsgálati vegyi anyag és a kontrollként szolgáló vegyi anyagok dózisa;

— az expozíciós időszak(ok) hossza és az expozíciós hőmérséklet(ek);

— a közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező és/vagy színváltozást okozó vizsgálati vegyi anyagokhoz alkalmazott kontrollok feltüntetése, amennyiben releváns;

— vizsgálati vegyi anyagonként és kontrollonként (pozitív kontroll, negatív kontroll, NSMTT, $NSC_{élő}$ és NSC_{elhalt}, ha releváns), valamint az egyes expozíciós időszakok során használt szövetreplikátumok;

— a használt RhE-modell alapján alkalmazott döntési kritériumok/előrejelzési modell leírása;

— a vizsgálati eljárás (többek között a mosási eljárások) bármilyen változtatásának leírása.

A vizsgálatmenet és a vizsgálat elfogadásának kritériumai:

— a pozitív és negatív kontrollok átlagértéke és elfogadhatósági tartománya a korábbi adatokon alapul;

— a pozitív és negatív kontrollokban használt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás;

▼M8

— a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás.

Eredmények:

— az egyes vizsgálati vegyi anyagokra és kontrollokra, minden expozíciós időpontra, vizsgálatmenetre és szövetmérésre vonatkozó adatok, többek között az OD-érték vagy az MTT-formazán csúcsterület, szövetek életképességi aránya, szövetek átlagos életképességi aránya, a replikátumok közötti eltérések, szórások és/vagy variációs koefficiensek (amennyiben releváns) táblázatba foglalása;

— amennyiben alkalmazandó, a közvetlen MTT-redukáló hatású és/vagy elszíneződést okozó vizsgálati vegyi anyagokhoz használt kontrollok eredményei, ideértve az OD-értéket vagy az MTT-formazán csúcsterületet, az NSMTT, az $NSC_{élő}$ és az NSC_{elhalt} arányt, a szövetreplikátumok közötti különbségeket, szórásokat és/vagy variációs koefficienseket (amennyiben releváns), és a szövetek helyes végső életképességi arányát;

— a meghatározott vizsgálatmenet és a vizsgálat elfogadhatósági kritériumai tekintetében a vizsgálati vegyi anyaggal/anyagokkal és a kontrollként szolgáló vegyi anyagokkal kapott eredmények;

— a megfigyelt egyéb hatások leírása.

— az alkalmazott előrejelzési modellel/döntési kritériumokkal összhangban kialakított osztályozás.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York valamint Geneva. Elérhető a következő címen:http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) E melléklet B.4., Akut bőrirritáció/bőrkorrózió fejezete.

(3) E melléklet B.40., *In vitro* bőrkorrózió fejezete.

(4) E melléklet B.65., *In vitro* Membrán barrier vizsgálati módszer fejezete.

(5) E melléklet B.46., *In vitro* bőrirritáció: Rekonstruált emberi felhámmodellen végzett vizsgálati módszer című fejezete.

(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) Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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. (2001. május). Elérhető a következő címen: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

▼M8

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezés” megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (25).

Sejtek életképessége: a sejtpopulációk teljes aktivitását mérő paraméter (például a celluláris mitokondriális dehidrogenázoknak az MTT ([3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid, tiazolil kék] vitális festéket redukáló képessége), amely – a mért végponttól és az alkalmazott vizsgálati tervtől függően – korrelációt mutat az élő sejtek teljes számával és/vagy életképességével.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Egyezés: a kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. A kifejezést esetenként használják a pontosság megfelelőjeként, és úgy határozzák meg, mint a helyesen pozitívként vagy negatívként besorolt összes vizsgálati vegyi anyag aránya. Az egyezés nagy mértékben függ a vizsgálat tárgyát képező vizsgálati vegyi anyag típusaiban előforduló pozitív eredmények gyakoriságától (25).

ET_{50}: a referencia-vegyianyag meghatározott, állandó koncentrációban történő alkalmazása esetén a sejt életképességének 50 %-kal való csökkentéséhez szükséges expozíciós idő meghatározásával becsülhető meg, lásd még az IC_{50}-et.

GHS (a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszere): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

HPLC:: nagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

IATA: integrált vizsgálati és értékelési megközelítés.

IC_{50}: annak a koncentrációnak a meghatározásával becsülhető meg, amelynél egy adott referencia-vegyianyag egy meghatározott expozíciós idő elteltével 50 %-kal (IC_{50}) csökkenti a szövetek életképességét; lásd még az ET_{50}-et.

Végtelen dózis: az epidermiszen alkalmazott vizsgálati vegyi anyag azon mennyisége, amely meghaladja az epidermisz felszínének teljes és egyenletes befedéséhez szükséges mennyiséget.

Keverék: két vagy több anyagból álló keverék vagy oldat, amelyben az anyagok nem lépnek egymással reakcióba.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

▼M8

MTT: 3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid; tiazolil kék tetrazólium-bromid.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő több mint 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

NK: nem korrozív.

NSC_{elhalt} kontroll: elhalt szöveteken végzett, nem specifikus színeződést mérő kontroll.

$NSC_{élő}$ kontroll: élő szöveteken végzett, nem specifikus színeződést mérő kontroll.

NSMTT: nem specifikus MTT-redukció.

OD: optikai sűrűség.

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó vegyi anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Teljesítményszabványok: hitelesített referenciamódszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és iii. a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, azokhoz hasonló megbízhatósági és pontossági szint, amelyet a javasolt vizsgálati módszernek teljesítenie kell a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke szerinti értékelése során (25).

Relevancia: a vizsgálati módszer és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálati módszer mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (25).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (25).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos negatív kontrollal és egy pozitív kontrollal.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálati módszer helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (25).

▼**M8**

In vivo bőrkorrózió: a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően négy órán belül megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, azaz a felhámon át az irhára is átterjedő látható szövetelhalás. A korróziós reakciót fekélyek, vérzés, véres var, illetve a 14 napos megfigyelési időszak végén a bőr kifehéredése miatti elszíneződések, teljesen szőrtelen területek és hegek jellemzik. A kérdéses lézió értékeléséhez figyelembe kell venni a kórszövettant.

Specificitás: a vizsgálati módszerrel helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (25).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálati vegyi anyag:: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UPLC: ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, valamint komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

▼M8

2. függelék

A BŐRKORRÓZIÓS VIZSGÁLATKÉNT VALIDÁLT RHE VIZSGÁLATI MODELLEK FŐBB ÖSSZETEVŐI

A vizsgálati modell összetevői	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
A modell felülete	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
A szövetreplikátumok száma	Expozíciós időszakonként legalább 2	Expozíciós időszakonként legalább 2–3	Expozíciós időszakonként legalább 2	Expozíciós időszakonként legalább 2
A kezelési dózisok és alkalmazásuk	Folyadékok és viszkózus anyagok: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Szilárd anyagok: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5 µl NaCl-oldat (9 g/l) Viaszos/ragadós anyagok: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) nejlonhálóval	Folyadékok: 50 µl (79,4 µl/cm^2) nejlonhálóval vagy anélkül *Elővizsgálat a vizsgálati vegyi anyag nejlonhálóval való kompatibilitására* Félszilárd anyagok: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Szilárd anyagok: 25 µl H_2O (vagy szükség esetén több) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Viaszos anyagok: kb. 8 mm átmérőjű lapos „korongszerű” darab helyezendő a 15 µl H_2O-val megnedvesített szövetre.	Folyadékok és viszkózus anyagok: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm^2) nejlonháló használatával *Elővizsgálat a vizsgálati vegyi anyag nejlonhálóval való kompatibilitására* Szilárd anyagok: 20 µl ± 2 µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Viaszos/ragadós anyagok: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) nejlonháló használatával	Folyadékok: 50 µl (83,3 µl/cm^2) nejlonháló használatával *Elővizsgálat a vizsgálati vegyi anyag nejlonhálóval való kompatibilitására* Félszilárd anyagok: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Szilárd anyagok: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (vagy szükség esetén több) Viaszos anyagok: kb. 8 mm átmérőjű lapos „keksz alakú” darab helyezendő a 15 µl H_2O-val megnedvesített szövetre
Közvetlen MTT-redukáló hatás előzetes felmérése	50 µl (folyadék) vagy 20 mg (szilárd)+ 2 ml MTT 0,3 mg/ml oldat 180 ± 5 percig 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, vízben elölt adaptált kontrollt kell végezni	50 µl (folyadék) vagy 25 mg (szilárd)+ 1 ml MTT 1 mg/ml oldat 60 percig 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, fagyasztással elölt adaptált kontrollt kell végezni	40 µl (folyadék) vagy 20 mg (szilárd)+ 1 ml MTT 1 mg/ml oldat 180± 15 percig 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, fagyasztással elölt adaptált kontrollt kell végezni	50 µl (folyadék) vagy 25 mg (szilárd)+ 1 ml MTT 1 mg/ml oldat 60 percig 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, fagyasztással elölt adaptált kontrollt kell végezni

▼M8

A vizsgálati modell összetevői	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Színinterferencia előzetes felmérése	10 µl (folyadék) vagy 10 mg (szilárd) + 90 µl H_2O szobahőmérsékleten keverve 15 percig → ha az oldat elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni	50 µl (folyadék) vagy 25 mg (szilárd) + 300 µl H_2O 60 percre 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett → ha az oldat elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni	40 µl (folyadék) vagy 20 mg (szilárd) + 300 µl H_2O szobahőmérsékleten keverve 60 percig → ha a vizsgálati vegyi anyag elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni	50 µl (folyadék) vagy 25 mg (szilárd) + 300 µl H_2O 60 percre 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett → ha az oldat elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni
Expozíciós idő és hőmérséklet	3 perc, 60 perc (± 5 perc) és 240 perc (± 10 perc) Szellőztetett fülkében Szobahőmérsékleten (szobahőm., 18–28 °C)	3 perc szobahőmérsékleten, és 60 perc 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett	3 perc szobahőmérsékleten, és 60 perc 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett	3 perc szobahőmérsékleten, és 60 perc 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett
Öblítés	25 ml 1x PBS (2 ml/öblítésenként)	20 alkalommal mosni 1x PBS-sel	20 alkalommal mosni 1x PBS-sel	20 alkalommal mosni 1x PBS-sel
Negatív kontroll	50 µl NaCl-oldat (9 g/l) Minden expozíciós időpontban vizsgálva	50 µl H_2O Minden expozíciós időpontban vizsgálva	40 µl H_2O Minden expozíciós időpontban vizsgálva	50 µl H_2O Minden expozíciós időpontban vizsgálva
Pozitív kontroll	50 µl jégecet Csak 4 órán át vizsgálva	50 µl 8N KOH Minden expozíciós időpontban vizsgálva	40 µl 8N KOH Csak 1 órán át vizsgálva	50 µl 8N KOH Minden expozíciós időpontban vizsgálva
MTT-oldat	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT inkubációs idő és hőmérséklet	180 perc (± 15 perc) 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett	180 perc 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett	180 perc (± 15 perc) 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett	180 perc 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH mellett

▼M8

A vizsgálati modell összetevői	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Extraháló oldószer	500 µl savasított izopropanol (0,04 N HCl izopropanolban) (izolált szövetet teljesen bemerítve)	2 ml izopropanol (kinyerés az inzert tetejéről és aljáról)	1,5 ml izopropanol (kinyerés az inzert tetejéről és aljáról)	2 ml izopropanol (kinyerés az inzert tetejéről és aljáról)
Extrakciós időtartam és hőmérséklet	Éjszakán át szobahőmérsékleten, fénytől védett helyen	Szobahőmérsékleten rázás nélkül éjszakán át vagy 120 perces rázatással (~120 rpm)	Szobahőmérsékleten rázás nélkül éjszakán át vagy 120 perces rázatással (~120 rpm)	Szobahőmérsékleten rázás nélkül éjszakán át vagy 120 perces rázatással (~120 rpm)
OD leolvasás	570 nm (545–595 nm) referenciaszűrő nélkül	570 nm (vagy 540 nm) referenciaszűrő nélkül	570 nm (540–600 nm) referenciaszűrő nélkül	540–570 nm referenciaszűrő nélkül
Szövet minőség-ellenőrzése	18 órás kezelés SDS-sel 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Kezelés 1 % Triton X-100-zal 4,08 óra ≤ ET_{50} ≤ 8,7 óra	Kezelés 1 % Triton X-100-zal 4,0 óra ≤ ET_{50} ≤ 10,0 óra	Kezelés 1 % Triton X-100-zal 2,0 óra ≤ ET_{50} ≤ 7,0 óra
Elfogadhatósági kritériumok	1. A negatív kontrollal (NaCl) kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének minden expozíciós időszakban legalább 0,6-nak és legfeljebb 1,5-nek kell lennie 2. A pozitív kontrollal (jégecet) 4 órán át kezelt szövetreplikátumok átlagos életképessége, a negatív kontrollhoz viszonyított százalékos arányban kifejezett értéke nem haladhatja meg a 20 %-ot 3. 20–100 %-os életképességi tartományban és legalább 0,3-as OD-értéknél a két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem haladhatja meg a 30 %-ot	1. A negatív kontrollal (H_2O) kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének minden expozíciós időszakban legalább 0,8-nak és legfeljebb 2,8-nak kell lennie 2. A pozitív kontrollal (8N KOH) 1 órán át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem érheti el a 15 %-ot 3. 20–100 %-os életképességi tartományban a szövetreplikátumok közötti variációs koefficiens nem haladhatja meg a 30 %-ot.	1. A negatív kontrollal (H_2O) kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének minden expozíciós időszakban legalább 0,8-nak és legfeljebb 3,0-nak kell lennie 2. A pozitív kontrollal (8N KOH) 1 órán át (adott esetben 4 órán át) kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem érheti el a 15 %-ot 3. 20–100 %-os életképességi tartományban és legalább 0,3-as OD-értéknél a két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem haladhatja meg a 30 %-ot.	1. A negatív kontrollal (H_2O) kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének minden expozíciós időszakban legalább 0,8-nak és legfeljebb 2,8-nak kell lennie 2. A pozitív kontrollal (8N KOH) 1 órán át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem érheti el a 20 %-ot 3. 20–100 %-os életképességi tartományban és legalább 0,3-as OD-értéknél a két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem haladhatja meg a 30 %-ot.

▼M8

3. függelék

A VIZSGÁLATI MODELLEKNEK AZ ALKATEGÓRIÁBA SOROLÁS TERÉN NYÚJTOTT TELJESÍTMÉNYE

Az alábbi táblázat ismerteti a négy vizsgálati modellnek a vizsgálat négy kidolgozója által tesztelt, 80 vegyi anyagon nyújtott teljesítményét. A számításokat az OECD Titkársága végezte el, amelyek eredményét egy szakértői alcsoport vizsgálata felül és hagyta jóvá (21) (23).

Az EpiSkin™, az EpiDerm™, a SkinEthic™ és az epiCS® vizsgálati modellekkel elvégezhető az alkategóriába sorolás (vagyis 1A vagy 1B és 1C vagy nem korrozív (NK)).

A négy vizsgálati modell teljesítménye, felülkategorizálási aránya, alulkategorizálási aránya és pontossága (előrejelző képessége) az összes vizsgálati modellben 2 vagy 3 vizsgálatmenet során vizsgált, 80 elemből álló vegyi anyag készlet alapján:

ELŐREJELZÉSI STATISZTIKA A TELJES VEGYI ANYAG KÉSZLET ALAPJÁN

(n= 80 vegyi anyag 2 független vizsgálatmenetben vizsgálva az epiCS® esetében, illetve 3 független vizsgálatmenetben vizsgálva az EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ és SkinEthic™ RHE esetében, ami 159 (*), illetve 240 besorolást jelent)

	EpiSkin™	EpiDerm ™	SkinEthic™	epiCS®
Felülkategoriázálások:				
1B–1C osztályba tartozók 1A osztályba sorolása	21,50 %	29,0%	31,2%	32,8%
NK-anyagok 1B–1C osztályba sorolása	20,7%	23,4%	27,0 %	28,4 %
NK-anyagok 1A osztályba sorolása	0,00%	2,7%	0,0 %	0,00%
Felülkategorizálás korr.	20,7%	26,1%	27,0%	28,4%
Összesített felülkategorizálási ráta (minden kategória)	**17,9%**	**23,3%**	**24,5%**	**25,8%**
Alulkategorizálások:				
1A osztályba tartozók 1B–1C osztályba sorolása	16,7%	16,7 %	16,7%	12,5 %
1A osztályba tartozók NK-anyagként való besorolása	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1B–1C osztályba tartozók NK-anyagként való besorolása	2,2%	0,00%	7,5%	6,6%
Összesített alulkategorizálási ráta (minden kategória)	**3,3%**	**2,5%**	**5,4%**	**4,4%**
Helyes kategorizálások:				
1A osztályba tartozók helyes besorolása	83,3%	83,3%	83,3%	87,5%
1B–1C osztályba tartozók helyes besorolása	76,3%	71,0%	61,3%	60,7%
NK-anyagok helyes besorolása	79,3%	73,9%	73,0%	71,62%
Összesített pontosság	**78,8%**	**74,2%**	**70%**	**69,8%**

NC: Nem korrozív

(*) az egyik vegyi anyagot egyszer vizsgálták az epiCS® modellben, mert nem állt rendelkezésre (23)

▼**M8**

4. függelék

A rekonstruált emberi felhámszövetből kivont MTT-formazán mérésére használt HPLC/UPLC spetrofotometriás rendszer minősítésének főbb paraméterei és elfogadhatósági kritériumai

Paraméter	Az FDA-iránymutatás szerinti protokoll (37) (38)	Elfogadhatósági kritériumok
Szelektivitás	Izopropanol elemzése, élő vakpróba (nem kezelt élő RhE-szövetekből kivont izopropanol), elhalt vakpróba (nem kezelt elhalt RhE-szövetekből kivont izopropanol)	$Terület_{interferencia} \leq Terület_{AMHÉ}$[1] 20 %-a ([1])
Precizitás	Minőség-ellenőrzések (vagyis MTT-formazán 1,6 μg/ml, 16 μg/ml és 160 μg/ml mellett) izopropanolban (n=5)	Variációs koefficiens ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a
Pontosság	Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Eltérési arány ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a
Mátrixhatás	Minőség-ellenőrzés élő vakpróbán (n=5)	85 % ≤ Mátrixhatás % ≤ 115 %
Átvitel	Izopropanol elemzése egy FMHÉ[2] szabvány után ([2])	$Terület_{interferencia} \leq Terület_{AMHÉ}$ 20 %-a
Megismételhetőség (napon belüli)	3 független kalibrációs görbe (izopropanolba helyezett MTT-formazán 6 egymás utáni 1/3-os hígítása kezdve a FMHÉ-nél, vagyis 200 μg/ml-nél); Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Kalibrációs görbék: Eltérési arány ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a Minőség-ellenőrzések: Eltérési arány ≤ 15 % és variációs koefficiens ≤ 15 %
Megismételhetőség (napok közötti)	1. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 2. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 3. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3)	
Az MTT-formazán rövid távú stabilitása az RhE szövetkivonatban	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és 24 órás szobahőmérsékleten való tárolás után	Eltérési arány ≤ 15 %
Az MTT-formazán hosszú távú stabilitása az RhE szövetkivonatban, ha szükséges	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és több napi, meghatározott hőmérsékleten (pl. 4 °C, -20 °C, -80 °C) történő tárolás után	Eltérési arány ≤ 15 %

([1]) AMHÉ: Alsó meghatározási határérték, amely 1–2 %-os szöveti életképességet takar, vagyis 0,8 μg/ml.
([2]) FMHÉ: Felső meghatározási határérték, amely legalább kétszer akkora mint a negatív kontroll izopropanolban várható legmagasabb MTT-formazán koncentrációja, vagyis 200 μg/ml.

▼B

B.41. *IN VITRO* 3T3 NRU FOTOTOXICITÁS-VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 432 (2004) számú vizsgálattal.

1.1. BEVEZETÉS

A fototoxicitás a bőrnek először bizonyos vegyi anyagoknak, majd ezt követően (kisebb dózisoknál látható) fénynek való expozíciója után bekövetkező, vagy hasonlóan, valamely vegyi anyag szisztematikus alkalmazása után a bőr besugárzásával előidézett vagy felerősített toxikus reagálása.

Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálat a vizsgált anyag fénynek való expozíció következtében aktivált vegyi anyag által kiváltott fototoxikusságának meghatározására szolgál. A vizsgálat a vegyi anyagnak kitett sejtek életképességében fény jelenlétében, illetve hiányában bekövetkező relatív csökkenés által méri a fotocitotoxicitást. A vizsgálattal fototoxikusnak talált anyag valószínűleg a bőrre történő szisztematikus felvitelt és elosztást, illetve helyi alkalmazást követően, *in vivo* is fototoxikus.

Számos különböző vegyi anyagról megállapították, hogy fototoxikus hatást váltanak ki (1) (2) (3) (4). Ezek közös tulajdonsága, hogy képesek a napfénytartományon belül fényenergiát elnyelni. A fotokémia első törvénye (a Grotthaus–Draper-törvény) szerint a fotoreakcióhoz elegendő fénykvantum abszorpciójára van szükség. Ezért bármely biológiai vizsgálat elvégzése előtt az OECD 101. vizsgálati iránymutatásának megfelelően meg kell határozni a vizsgált vegyi anyag UV/látható fény abszorpciós spektrumát. Egyes javaslatok szerint ha a molekuláris extinkciós/abszorpciós együttható kisebb mint 10 liter × mol^{-1} × cm^{-1}, akkor a vegyi anyag valószínűleg nem fotoreaktív. Az ilyen vegyi anyagot nem valószínű, hogy a káros fotokémiai hatások kimutatása céljából az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálattal vagy más biológiai vizsgálattal tesztelni kell (1) (5). Lásd az 1. függeléket is.

Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálat megbízhatósága és alkalmassága nemrégiben értékelésre került (6) (7) (8) (9). Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálatról kimutatták, hogy előre jelzi az állatokban és az emberben *in vivo* jelentkező akut fototoxikus hatásokat. A vizsgálat nem alkalmas egyéb olyan káros hatások kimutatására, amelyek vegyi anyagok és a fény együttes hatása alapján jelentkezhetnek, például nem mutatja ki a fotogenotoxicitást, a fotoallergiát vagy a fotokarcinogenitást, és nem alkalmas a fototoxikusság mennyiségi kifejezésére. A vizsgálatnak nem célja a fototoxicitás indirekt mechanizmusainak, a vizsgálati anyag metabolitjai által kiváltott hatásoknak vagy az elegyek hatásainak mérése sem.

Bár az anyagcserét folytató szervezetek használata általános követelmény minden genotoxikus és rákkeltő hatás előrejelzését célzó *in vitro* vizsgálat esetében, a fototoxicitás esetében mindeddig csak elenyésző számú esetben találták úgy, hogy anyagcseretranszformáció szükséges ahhoz, hogy a vegyi anyag *in vivo* vagy *in vitro* fototoxinként viselkedjen. Így nem szükséges és tudományos szempontból sem indokolt, hogy a jelen vizsgálatot anyagcsereaktív szervezettel kelljen elvégezni.

▼B

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Irradiancia: valamely felületre eső ultraibolya (UV) vagy látható beeső fény intenzitása, W/m^2-ben vagy mW/cm^2-ben mérve.

Fénydózis: valamely felületre eső ultraibolya (UV) vagy látható beeső sugárzás mennyisége (= intenzitás × idő), Joule (= W × s) per felületegységben (pl. J/m^2 vagy J/cm^2) kifejezve.

UV-fény-hullámsávok: a CIE (Nemzetközi Világítástechnikai Bizottság) ajánlása szerinti jelölések: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) és UVC (100–280 nm). Más jelölések is használatosak; az UVB és UVA közötti választóvonalat gyakran 320 nm-re teszik, és az UVA felosztható UV-Al-re és UV-A2-re, ahol a határvonal körülbelül 340 nm.

A sejt életképessége: valamely sejtpopuláció teljes aktivitását mérő paraméter (pl. a vitális neutrálvörös festékanyag felvétele a sejtek lizoszómájába), amely a mérési végponttól és az alkalmazott vizsgálat felépítésétől függően korrelál a sejtek összmennyiségével és/vagy vitalitásával.

Relatív sejtéletképesség: a sejt életképessége a teljes vizsgálati eljáráson (vagy +Irr vagy –Irr) keresztülvitt, de a vizsgált vegyi anyaggal nem kezelt (negatív) kontrolloldószerekhez képest kifejezve.

PIF (fotoirritációs tényező): a vizsgált vegyi anyag nem citotoxikus UV A/látható fénnyel való besugárzás hiányában (–Irr) és annak jelenlétében (+Irr) előállított két, egyenlően hatékony citotoxikus koncentrációjának (IC_{50}) összehasonlításával meghatározott tényező.

IC_{50}: a vizsgált vegyi anyag azon koncentrációja, amelynél a sejt életképessége 50 %-ra esik vissza.

MPE (átlagos fényhatás): nem citotoxikus UV A/látható fénnyel való besugárzás hiányában (–Irr) és annak jelenlétében (+Irr) előállított koncentráció-válaszgörbék matematikai elemzéséből származtatott jellemző.

Fototoxicitás: olyan akut toxikus reakció, amelyet a bőr előbb bizonyos vegyi anyagoknak, majd azután fénynek való expozíciója idéz elő, vagy amelyet hasonlóan, valamely vegyi anyag szisztematikus alkalmazása után a bőr besugárzása idézi elő.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálat egy vegyi anyagnak a szimulált napfény nem citotoxikus dózisának jelenlétében és anélkül való expozíciója során kimutatott citotoxicitásának összehasonlításán alapul. A citotoxicitást ebben a vizsgálatban a vitális neutrálvörös festékanyag felvételének koncentrációfüggő csökkenésével fejezik ki, amelyet 24 órával a vizsgálati vegyi anyaggal való kezelés és a besugárzás után mérnek (10). Az NR (neutrálvörös) egy gyengén kationos festékanyag, amely diffúzió nélkül könnyedén áthatol a sejthártyán, majd a sejten belül a lizoszómában összegyűlik. Az érzékeny lizoszómamembrán felületének módosulásai a lizoszóma törékenységéhez és egyéb elváltozásaihoz vezetnek, amelyek egyre inkább visszafordíthatatlanná válnak. Ezeknek a xenobiotikumok által előidézett változásoknak a következménye, hogy az NR felvétele és megkötése lecsökken. Így lehetőség van az életképes, a sérült vagy a halott sejtek megkülönböztetésére, ami ennek a vizsgálatnak az alapja.

▼B

Balb/c 3T3 sejteket 24 órán át tenyésztenek monorétegek képződésének céljából. Vizsgált vegyi anyagonként két 96 lyukú lemezt egy órán keresztül előinkubálnak a vizsgálati anyag nyolc különböző koncentrációjával. Ezek után a két lemez közül az egyiket a legnagyobb dózisú nem citotoxikus sugárzásnak teszik ki, miközben a másik lemezt sötétben tartják. Ezt követően mindkét lemezen a kezelési közeget tenyésztőközegre cserélik, és további 24 órás inkubációs idő elteltével meghatározzák a sejt életképességét a neutrálvörös felvétele alapján. A sejt életképességét a kezeletlen kontrolloldószer százalékában fejezik ki, és minden vizsgálati koncentrátumra vonatkozóan kiszámítják. A fototoxicitás meghatározása érdekében összehasonlítják a besugárzás jelenlétében vagy annak hiányában kapott koncentrációtól függő reakciókat, általában IC_{50} szinten, azaz a sejt életképességét 50 %-ra csökkentő koncentráció összehasonlítva a kezeletlen kontollanyaggal.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Előkészületek**

1.4.1.1. Sejtek

A validálási célú vizsgálat során az Amerikai Fajtakultúra Gyűjteményből (ATCC, Manassas, VA, USA), illetve az Európai Sejtkultúra Gyűjteményből (ECACC, Salisbury, Wiltshire, Egyesült Királyság) származó állandó egér fibroblaszt sejtvonal (Balb/c 3T3) 31. sz. klónját használták, ezért ajánlatos jól minősített sejtlerakatból ilyen sejteket beszerezni. Ugyanebben a vizsgálati eljárásban más sejtek vagy sejtvonalak is használhatók, de a tenyésztés feltételeit hozzá kell igazítani a sejtek egyedi igényeihez, és ki kell mutatni az egyenértékűséget.

A sejteket rendszeresen ellenőrizni kell, hogy nem történt-e mikoplazma-fertőzés, és csak azok a sejtek használhatók fel, amelyekben ilyet nem találtak (11).

Fontos, hogy az ebben a módszerben leírt minőség-ellenőrzési eljárásnak megfelelően rendszeresen ellenőrizzék a sejtek UV-érzékenységét. Mivel a sejtek UVA-érzékenysége a passzázsok számával nőhet, a lehető legkisebb, lehetőleg 100-nál kisebb passzázsszámú Balb/c 3T3 sejteket kell használni (lásd az 1.4.2.2.2. szakaszt és a 2. függeléket).

1.4.1.2. Tenyésztőközegek és tenyésztési körülmények

A rutinszerű szaporítás és a vizsgálati eljárás során megfelelő tenyésztőközeget és inkubálási körülményeket kell alkalmazni, például a Balb/c 3T3 sejtek esetében ez DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kiegészítve 10 % újszülöttborjú-szérummal, 4mM glutamin, penicillin (100 IU) és sztreptomicin (100 μg/ml), valamint párásított inkubálás 37 °C-on, 5–7,5 % CO_2 a puffertől függően (lásd az 1.4.1.4. szakasz második bekezdését.). Különösen fontos, hogy a sejttenyésztés körülményei a használt sejtek vagy sejtvonalak normál sejtciklusidején belüli időtartamot biztosítsanak.

1.4.1.3. A tenyészetek elkészítése

Fagyasztott sejtkultúra-állományból származó sejteket megfelelő sűrűségben ráoltanak a tenyésztőközegre, és az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálatban történő felhasználást megelőzően legalább egyszer másodlagos tenyészetet hoznak létre.

▼B

A fototoxicitás-vizsgálathoz használt sejteket olyan sűrűségben oltják rá a tápoldatra, hogy mindaddig ne következzen be a tenyészetek konfluenciája, amíg a sejtráoltás után 48 órával meg nem határozzák a sejtek életképességét. A 96 lyukú lemezeken tenyésztett Balb/c 3T3 sejtek esetében a javasolt elhelyezési sűrűség 1×10^4 sejt/lyuk.

Minden egyes vizsgálandó vegyi anyag esetében a sejteket két darab 96 lyukú lemezre kell ráoltani, amelyeket azután párhuzamosan, a teljes vizsgálati eljárás folyamán egyforma tenyésztési feltételek között kell tartani, kivéve azt az időszakot, amikor az egyik lemezt besugározzák (+Irr), míg a másikat sötétben tartják (–Irr).

1.4.1.4. A vizsgálandó anyag elkészítése

A vizsgálandó anyagokat frissen, közvetlenül a felhasználás előtt kell elkészíteni, kivéve akkor, ha a tárolás során való stabilitásukat adatok igazolják. Ajánlatos minden vegyi kezelést és a sejtek kezdeti kezelését olyan fényviszonyok mellett elvégezni, hogy a besugárzást megelőzően ne következhessen be a vizsgálandó anyag fotoaktivitása vagy degradációja.

A vizsgálandó vegyi anyagokat pufferolt sóoldatban, például Earle-féle kiegyenlített sóoldatban (EBSS) vagy egyéb fiziológiailag kiegyenlített pufferoldatban fel kell oldani; az oldatok nem tartalmazhatnak fehérjekomponenseket, fény elnyelő komponenseket (pl. pH-jelző színeket és vitaminokat) annak érdekében, hogy elkerülhető legyen a besugárzás alatti interferencia. Mivel a besugárzás során a sejteket mintegy 50 percig a CO_2-inkubátoron kívül tartják, ügyelni kell arra, hogy ne következhessen be alkalizáció. Gyenge puffer, például EBSS használata esetén ez a sejtek 7,5 % CO_2-ban való inkubációjával érhető el. Ha a sejteket csak 5 % CO_2-ban inkubáljuk, akkor erősebb puffert kell választani.

A vízben kevéssé oldódó vizsgálandó vegyi anyagokat megfelelő oldószerben kell feloldani. Ha oldószert használnak, akkor annak állandó mennyiségben kell jelen lennie minden tenyészetben, azaz a negatív kontrollban (kontrolloldatban) éppúgy, mint a vizsgált vegyi anyag minden koncentrációjában, továbbá ebben a koncentrációban nem szabad citotoxikusnak lennie. A vizsgált vegyi anyag koncentrációit úgy kell megválasztani, hogy a csapadékképződés és az oldat zavarossága elkerülhető legyen.

A javasolt oldószerek a dimetil-szulfoxid (DMSO) és az etanol (ETOH). Más kis citotoxicitású oldószerek is alkalmasak lehetnek. A használat előtt az oldószereket jellegzetes tulajdonságaik szempontjából meg kell vizsgálni, például reakció a vizsgálandó vegyi anyaggal, a fototoxikus hatás elfojtása, radikális tisztítási jellemzők és/vagy kémiai stabilitás az oldószerben.

Az oldódás örvényes elegyítéssel és/vagy szonikus beavatkozással és/vagy megfelelő hőmérsékletre történő felmelegítéssel elősegíthető, kivéve akkor, ha ez a vizsgálandó vegyi anyag stabilitását befolyásolja.

▼B

1.4.1.5. Besugárzási körülmények

1.4.1.5.1. Fényforrás

A fototoxicitás-vizsgálat során nagyon lényeges szempont a megfelelő fényforrás és szűrők megválasztása. Az *in vivo* fototoxikus reakciók általában az UVA-fényhez és a látható tartományokhoz kapcsolódnak (3) (12), míg az UVB általában kisebb jelentőségű, de erősen citotoxikus; a citotoxicitás 1 000-szeresére nő, ha a hullámhossz 313 nm-ről 280 nm-re változik (13). A megfelelő fényforrás kiválasztása során kritériumként azt a követelményt is figyelembe kell venni, hogy a fényforrás által kibocsátott hullámhosszt a vizsgált vegyi anyagnak el kell nyelnie (abszorpciós spektrum), és a fény (ésszerű expozíciós idő alatt elérhető) dózisának elegendőnek kell lennie az ismert fotocitotoxikus vegyi anyagok kimutatásához. Ezenkívül az alkalmazott hullámhossz és dózis indokolatlanul nem károsíthatja a vizsgálati rendszert, például a hőkibocsátást (infravörös tartomány).

Optimális mesterséges fényforrásnak a napfény napfényszimulátorral történő szimulációja tekinthető. A szűrtnapfény-szimulátor spektrális energiaeloszlásának a szabadtéri nappali fény (14) szerinti spektrális energiaeloszlása közelében kell lennie. Napfényszimulátorként xenon ívfényeket és (bevont) higany-fém halogenid ívfényeket használnak (15). Ez utóbbiaknak az az előnye, hogy kevesebb hőt sugároznak és olcsóbbak, de a napfényhez nem hasonlítanak olyan tökéletesen, mint a xenon ívfények. Mivel minden napfényszimulátor jelentős mennyiségű UVB-t bocsát ki, a nagy citotoxicitású UVB-hullámhosszok csökkentése érdekében megfelelő szűrést kell alkalmazni. Mivel a sejtkultúra műanyag anyagai UV-stabilizátorokat tartalmaznak, a spektrumot ugyanolyan 96 lyukú lemezfedélen át kell mérni, mint amilyet a vizsgálat során használnak. Függetlenül attól, hogy a spektrum egyes részeit milyen módszerrel szűrjük ki, illetőleg függetlenül az alkalmazott eszközök elkerülhetetlen szűrőhatásától, a szűrők mögött regisztrált spektrum nem térhet el a szabványos szabadtéri nappali fényétől (14). A (8) és a (16) irodalomban található egy példa az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálat validálási vizsgálatában használt szűrtnapfény-szimulátor spektrális irradianciaeloszlására. Lásd még a 2. függelék 1. ábráját is.

1.4.1.5.2. Dozimetria

Minden fototoxicitás-vizsgálat előtt megfelelő széles sávú UV-mérővel rendszeresen ellenőrizni kell a fény intenzitását (az irradianciát). Az intenzitást ugyanolyan 96 lyukú lemezfedélen át kell mérni, mint amilyet a vizsgálat során használnak. Az UV-mérőt a fényforráshoz kell kalibrálni. Ellenőrizni kell az UV-mérő viselkedését, erre a célra ajánlatos ugyanolyan típusú és ugyanúgy kalibrált másik UV-mérőt használni. Ideális esetben nagyobb időközönként spektroradiométerrel meg kell mérni a szűrt fényforrás spektrális irradianciáját, illetőleg ellenőrizni kell a széles sávú UV-mérő kalibrálását.

A vizsgálatok szerint az 5 J/cm^2 dózis (az UVA-tartományban mérve) a Balb/c 3T3 sejtekre nézve nem citotoxikus, és kellően hatékony ahhoz, hogy aktiválja a vegyi anyagokat a fototoxikus reakció kiváltására (6) (17), például 5 J/cm^2 50 perc alatt történő eléréséhez 1,7 mW/cm^2 irradianciát kellett beállítani. Lásd a 2. függelék 2. ábráját. Másik sejtvonal vagy másik fényforrás használata esetén előfordulhat, hogy a sugárdózist úgy kell kalibrálni, hogy olyan sugárzási dózist lehessen kiválasztani, hogy az ne károsítsa a sejteket, de elegendő legyen ahhoz, hogy szabályszerű fototoxicitást váltson ki. A fénynek való expozíció idejét a következőképpen kell kiszámítani:

▼B

$$\text{t(perc)} = \frac{\text{sugárdózis } (J/cm^2) \times 1000}{\text{irradiancia } (mW/cm^2) \times 60} \qquad (1J=1\ Wsec)$$

1.4.2. **Vizsgálati körülmények**

1.4.2.1. A vizsgált anyag koncentrációi

A fény jelenlétében (+Irr) vagy hiányában (–Irr) vizsgált vegyi anyag koncentrációinak alkalmas tartományát dózistartomány-meghatározási kísérletek során kell meghatározni. Az oldhatóságot érdemes lehet kétszer: az első alkalom után 60 perc (vagy bármilyen más kezelési idő) elteltével másodszor is megállapítani, mivel az oldhatóság időben, illetve az expozíció során megváltozhat. A nem megfelelő tenyésztési feltételek, illetve az erősen savas vagy lúgos vegyi anyagok által kiváltott toxicitás elkerülése érdekében a vizsgált vegyi anyaggal kezelt sejtkultúrák pH-jának a 6,5–7,8 tartományban kell lennie.

A vizsgált anyag legnagyobb koncentrációjának a fiziológiai vizsgálati feltételeken belül kell lennie, például az ozmotikus és a pH-feszültséget kerülni kell. A vizsgált vegyi anyagtól függően szükséges lehet más olyan fizikai-kémiai tulajdonságokat is figyelembe venni, amelyek behatárolják a legnagyobb vizsgálati koncentrációt. A telítettségi pontnak megfelelő koncentrációig nem toxikus, viszonylagosan oldhatatlan anyagok esetében a fizikailag lehetséges legnagyobb koncentrációt kell vizsgálni. Általánosságban a vizsgált vegyi anyag kicsapódását minden vizsgálati koncentrációban kerülni kell. A vizsgált anyag maximális koncentrációja ne haladja meg a 1 000 μg/ml-t; az ozmolalitás ne haladja meg a 10 mmolart. Nyolc vizsgálati koncentrációból álló, konstans hígítási tényezőjű geometriai oldatsorozatot kell használni (lásd a 2.1. szakasz második bekezdését).

Ha a dózistartomány-meghatározási vizsgálat azt jelzi, hogy a vizsgálandó vegyi anyag a sötétben végzett kísérletben (–Irr) a koncentrációs határig nem citotoxikus, de besugárzás hatására (+Irr) erősen citotoxikus, az adatminőségi követelmény teljesítéséhez a (+Irr) kísérletek céljára kiválasztott koncentrációs tartományok különbözhetnek a (–Irr) kísérletekhez kiválasztottaktól.

1.4.2.2. Ellenőrzések

1.4.2.2.1. A sejtek sugárérzékenysége, történeti adatok előállítása

A sejteket a fényforrásra való érzékenységük tekintetében életképességük meghatározásával, növekvő dózisú besugárzás alkalmazásával rendszeresen ellenőrizni kell (körülbelül minden ötödik passzázs után). Ebben a kiértékelésben több besugárzási dózist kell alkalmazni, köztük a 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálathoz használt szintnél jóval nagyobbakat is. E dózisok nagysága a legkönnyebben a fényforrás UV-részének mérésével határozható meg. A sejteket az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálatban használt sűrűségben kell behelyezni, majd másnap besugárzásnak kell őket alávetni. Ezután egy nappal a neutrálvörös felvétele alapján meghatározható a sejt életképessége. Ki kell mutatni, hogy a keletkező legnagyobb nem citotoxikus dózis (pl. a validálási vizsgálatban: 5 J/cm^2 [UVA]) elegendő a referenciavegyianyagok besorolásának helyes megállapításához (1. táblázat).

▼B

1.4.2.2.2. Sugár érzékenység, az aktuális vizsgálat ellenőrzése

A vizsgálat abban az esetben felel meg a minőségi követelménynek, ha a sugárkezelt negatív/kontrolloldószerek a nem sugárkezelt negatív/oldószerrel összehasonlítva 80 %-nál nagyobb életképességet mutatnak.

1.4.2.2.3. A kontrolloldószerek életképessége

A kontrolloldószerekből kivont neutrálvörös abszolút optikai sűrűsége ($OD_{540\ NRU}$) jelzi, hogy a lyukanként elhelyezett $1x10^4$ sejt a vizsgálat két napja alatt a rendes megkettőződési időnek megfelelően fejlődött-e. A vizsgálat akkor felel meg az elfogadási kritériumnak, ha a kezeletlen kontollok $OD_{540\ NRU}$ átlaga ≥ 0,4 (azaz körülbelül hússzorosa a háttéroldószer felszívóképességének).

1.4.2.2.4. Pozitív kontroll

Minden *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálattal párhuzamosan egy ismert fototoxikus vegyi anyagot is vizsgálni kell. Ajánlatos a klórpromazin (CPZ) használata. Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálatban a standard protokoll szerint megvizsgált CPZ esetében a következő elfogadási kritériumok kerültek meghatározásra: sugárkezelt (+Irr) CPZ: IC_{50} = 0,1 μg/ml-től 2,0 μg/ml-ig, nem sugárkezelt (–Irr) CPZ: IC_{50} = 7,0 μg/ml-től 90,0 μg/ml-ig. A fotoirritációs tényezőnek (PIF) 6-nál nagyobbnak kell lennie. A pozitív kontroll történeti viselkedését ugyancsak vizsgálni kell.

Klórpromazin helyett párhuzamos pozitív kontrollként más, a vizsgált vegyi anyag kémiai osztályához vagy oldhatósági jellemzőihöz illő fototoxikus vegyi anyagok is használhatók.

1.4.3. **Vizsgálati eljárás (6) (7) (8) (16) (17):**

1.4.3.1. 1. nap:

Adagoljunk 100 μl tenyésztőközeget egy 96 lyukú szövetkultúra mikrotiter lemezének periférikus lyukaiba (= üres lyukak). A fennmaradó lyukakba tegyünk 100 μl térfogatú, $1x10^5$ sejt/ml sejtet tartalmazó szuszpenziót (= $lxl0^4$ sejt/lyuk). A vizsgálandó anyag koncentrációinak minden egyes sorozatához, valamint a kontrolloldószerhez és a pozitív kontollokhoz két-két lemezt kell elkészíteni.

Inkubáljuk a sejteket 24 óráig (lásd az 1.4.1.2. szakaszt), míg félig konfluens monoréteget nem alkotnak. Ez az inkubációs idő lehetővé teszi a sejtek számára a megújulást, az adhéziót és az exponenciális növekedést.

1.4.3.2. 2. nap:

Az inkubációt követően a sejteket távolítsuk el a tenyésztőközegből, és óvatosan mossuk meg 150 μl, az inkubációhoz használt pufferoldattal. Adjunk hozzá 100 μl olyan puffert, amely megfelelő koncentrációban tartalmazza a vizsgálandó vegyi anyagot vagy az oldószert (kontrolloldószert). A vizsgálandó vegyi anyag 8 különböző koncentrációját alkalmazzuk. A vizsgálandó anyaggal 60 percen át sötétben inkubáljuk a sejteket (lásd az 1.4.1.2. szakaszt és az 1.4.1.4. szakasz második bekezdését).

A vizsgált anyagok koncentrációinak minden egyes sorozatához és a kontrollokhoz elkészített két-két lemezből általában véletlenszerűen válasszunk ki egyet-egyet a citotoxicitás meghatározásához (–Irr) (ez lesz a kontroll-lemez), és egyet (ez lesz a kezelt lemez) a fotocitotoxicitás meghatározásához (+Irr).

▼B

A +Irr expozíció elvégzéséhez a sejtek besugárzását szobahőmérsékleten 50 percen át végezzük a 96 lyukú lemez fedelén keresztül, a legnagyobb olyan sugárdózissal, amely még nem citotoxikus (lásd a 2. függeléket is). A nem sugárkezelt lemezt (–Irr) ugyancsak tartsuk 50 percig szobahőmérsékleten egy sötét dobozban (= fényexpozíciós idő).

Szűrjük le a tesztoldatot, és óvatosan mossuk kétszer 150 µl, az inkubációhoz használt, de a vizsgált anyagot nem tartalmazó pufferoldattal. Helyettesítsük a puffert tenyésztőközeggel és inkubáljuk (lásd az 1.4.1.2. szakaszt) egy éjszakán át (18–22 h).

1.4.3.3. 3. nap:

1.4.3.3.1. Mikroszkópos értékelés

A sejteket a növekedés, a morfológia és a monoréteg integritása tekintetében fáziskontrasztos mikroszkóppal kell megvizsgálni. A sejtek morfológiájában bekövetkezett változásokat és a sejtek növekedésében tapasztalt jelenségeket fel kell jegezni.

1.4.3.3.2. A neutrálvörös-felvétel vizsgálata

Mossuk meg a sejteket 150 µl előmelegített pufferrel. Gyenge ütögetéssel távolítsuk el a mosószert. Adjunk hozzá 100 µl 50 µg/ml neutrálvöröst (NR) (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin-hidroklorid, EINECS-szám: 209-035-8; CAS-szám: 553-24-2; C.I.: 50040) tartalmazó szérum nélküli közeget (16), és az oldatot inkubáljuk az 1.4.1.2. bekezdésben leírtak szerint 3 órán át. Az inkubáció után távolítsuk el az NR közeget, és mossuk meg a sejteket 150 µl pufferrel. Szűrjük le, és szárítással vagy centrifugálással távolítsuk el a felesleges puffert.

Adjunk hozzá pontosan 150 µl NR deszorpciós oldatot (frissen készítve 49 rész víz + 50 rész etanol + 1 rész ecetsav).

Egy mikrotiter rázólemezen 10 percen át óvatosan rázzuk a mikrotiter lemezt, mindaddig, amíg az NR elválik a sejtektől, és homogén oldatot nem képez.

Egy spektrofotométerben 540 nm-en, az üres lapokat referenciaként használva mérjük meg az NR-kivonat optikai sűrűségét. Az adatokat további elemzés céljából megfelelő elektronikus fájlformátumban mentsük el.

2. ADATOK

2.1. AZ ADATOK MINŐSÉGE ÉS MENNYISÉGE

A vizsgálat adatainak lehetővé kell tenniük a sugárzás jelenlétében és annak hiányában kapott koncentráció-válasz adatok elemzését, és amennyiben lehetséges, a vizsgált anyag azon koncentrációjának meghatározását, amelynél a sejt életképessége 50 %-ra csökken (IC_{50}). Ha citotoxicitást találunk, a koncentrációk tartományát és az egyedi koncentrációértékeket úgy kell felvenni, hogy a vizsgálati adatokra görbe legyen fektethető.

Az egyértelműen pozitív és az egyértelműen negatív eredmények esetében is (lásd a 2.3. szakasz első bekezdését) elegendő lehet az első vizsgálat, amelyet előzetes dózistartománykereső kísérlet(ek) előz(nek) meg.

▼B

A kétes eredményeket, a határeseteket és a nem egyértelmű eredményeket további vizsgálatok során tisztázni kell (lásd még a 2.4. szakasz második bekezdését). Ilyen esetekben fontolóra kell venni a vizsgálati körülmények módosítását. Azok a vizsgálati körülmények, amelyek módosulhatnak, magukban foglalják a koncentrációk tartományát és konkrét értékeit, az előinkubációs időt és a sugárzási-expozíciós időt. Vízben instabil viselkedésű vegyi anyagok esetében rövidebb expozíciós időt érdemes alkalmazni.

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Az adatok értékeléséhez a fotoirritációs tényezőt (PIF) vagy az átlagos fényhatást (MPE) célszerű meghatározni.

A fotocitotoxicitás-értékek kiszámításához (lásd lent) a diszkrét koncentráció-válasz értékpárokat folyamatos koncentráció-válasz görbével (modell) kell közelíteni. A görbének az adatokra való illesztése általában valamilyen nemlineáris regressziós módszerrel történik (18). Az adatokra illesztett görbéhez képest a tényleges adatok eltéréseinek hatását „bootstrap” eljárással célszerű vizsgálni.

A fotoirritációs tényező (PIF) a következő képlet segítségével számítható ki:

$$\mathrm{PIF} = \frac{\mathrm{IC}_{50}(-\mathrm{Irr})}{\mathrm{IC}_{50}(+\mathrm{Irr})}$$

Ha a fény jelenlétében vagy hiányában az IC_{50} nem számítható ki, a vizsgált anyag PIF értéke nem határozható meg. Az átlagos fényhatás (MPE) kiszámítása a teljes koncentráció-válasz görbék összehasonlításán alapul (19). Ez a mennyiség definíció szerint a fényhatásértékek reprezentatív csoportján vett súlyozott átlagot jelenti:

$$\mathrm{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i \mathrm{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

A PE_C fényhatás bármely C koncentrációban az RE_C válaszhatás és a DE_C dózishatás szorzata: $PE_c = RE_c \times DE_c$. Az RE_c válaszhatás a fény jelenlétében és hiányában megfigyelt válaszok különbsége: $RE_c = R_c\ (-\mathrm{Irr}) - R_c\ (+\mathrm{Irr})$. A dózishatást a következő összefüggés adja:

$$\mathrm{DE}_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

ahol C* az egyenérték-koncentráció, azaz az a koncentráció, amelynél C koncentráció esetén a +Irr válasz megegyezik a –Irr válasszal. Ha C* nem határozható meg, mert a +Irr görbe válaszértékei rendszeresen nagyobbak vagy kisebbek mint RC(–Irr), a dózishatást l-nek kell tekintetni. A wi súlyozó tényezőt a legnagyobb válaszérték adja, azaz $w_i = \mathrm{MAX}\ \{R_i\ (+\mathrm{Irr}), R_i\ (-\mathrm{Irr})\}$. A C_i koncentrációértékeket úgy kell megválasztani, hogy a vizsgált koncentrációértékek által kijelölt minden egyes intervallumba ugyanannyi pont essen. Az MPE kiszámítása azon koncentrációmaximumra korlátozódik, amelynél a két görbe közül legalább az egyik még legalább 10 % válaszértéket mutat. Ha ez a koncentrációmaximum nagyobb, mint a +Irr vizsgálat során alkalmazott legnagyobb koncentráció, akkor úgy kell tekinteni, hogy a +Irr görbe maradék részén a válaszérték nulla. A vegyi anyagot attól függően tekintjük fototoxikusnak, hogy az MPE érték nagyobb-e, mint egy gondosan megválasztott kritikus érték ($MPE_C = 0{,}15$).

▼B

A PIF és az MPE kiszámításához rendelkezésre áll egy szoftvercsomag (20).

2.3. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A validálási vizsgálat alapján (8), ha a vizsgált anyagra PIF < 2 vagy MPE < 0,1, akkor „nincs fototoxicitás”. Ha PIF > 2 és < 5 vagy MPE > 0,1 és < 0,15, akkor „lehetséges a fototoxicitás”; ha PIF > 5 vagy MPE > 0,15, akkor „van fototoxicitás”.

Minden olyan laboratóriumnak, amely először végzi ezt a vizsgálatot, a fototoxicitás-vizsgálat keretében a vizsgálandó anyagok tesztelése előtt meg kell vizsgálnia az 1. táblázatban felsorolt referenciaanyagokat. A PIF és az MPE értékeknek az 1. táblázatban található értékek közelében kell lenniük.

1. táblázat

Kémiai név	EINECS-szám	CAS-szám	PIF	MPE	Felszívodás maximuma	Oldószer [1]
Amiodaron-hidroklorid	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27–0,54	242 nm 300 nm (irányváltás)	etanol
Klórpromazin-hidroklorid	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33–0,63	309 nm	etanol
Norfloxacin	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
Protoporfirin IX, Dinátrium	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54–0,74	402 nm	etanol
L-Hisztidin		[7006-35-1]	nincs	0,05–0,10	211 nm	víz
Hexaklorofén	200-733-8	[70-30-4]	1,1-1,7	0,00–0,05	299 nm 317nm (irányváltás)	etanol
Nátrium-lauril-szulfát	205-788-1	[151-21-3]	1,0-1,9	0,00–0,05	Nincs felszívódás	víz

([1]) A felszívódás méréséhez használt oldószer.

2.4. AZ ADATOK KIÉRTÉKELÉSE

Ha a fototoxikus hatás csak a legnagyobb vizsgálati koncentrációban figyelhető meg (különösen a vízben oldódó vizsgált vegyi anyagoknál), a kockázatok értékeléséhez további szempontok is szükségesek lehetnek. Ilyen szempont lehet a bőrön keresztül történő felszívódásra, valamint a bőrben való vegyianyag-felhalmozódásra vonatkozó adatok és/vagy más kísérletekből származó adatok, például a vegyi anyagnak *in vitro* állati vagy emberi bőrön, illetve bőrmodelleken történő vizsgálata.

▼B

Ha nem mutatható ki toxicitás (+Irr és –Irr) és ha a gyenge oldhatóság behatárolta a vizsgálható koncentrációk számát, akkor megkérdőjelezhető, hogy a vizsgálat alkalmas-e a kérdéses anyag tesztelésére, és meg kell fontolni ellenőrző vizsgálatok elvégzését, például másik modell használatát.

3. **JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek legalább a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

— azonosítási adatok, közhasználatú generikus név és IUPAC- és CAS-szám, ha ismert,

— fizikai tulajdonságok és tisztaság,

— a vizsgálat elvégzése szempontjából lényeges fizikai-kémiai tulajdonságok,

— UV/látható fény-abszorpciós spektrum,

— szilárdság és fotostabilitás, ha ismert.

Oldószer:

— az oldószer kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált vegyi anyag oldószerben való oldhatósága,

— a kezelési közegben lévő oldószer aránya.

Sejtek:

— a sejtek típusa és eredete,

— a mikoplazma hiánya,

— a sejtpasszázsok száma, ha ismert,

— a sejtek sugárérzékenysége, amelyet az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálatban használt sugárkezelő eszközzel kell meghatározni.

Vizsgálati körülmények (1); *inkubáció a kezelés előtt és után:*

— a tenyésztőközeg típusa és összetétele,

— inkubációs körülmények (CO_2-koncentráció; hőmérséklet; páratartalom),

— az inkubáció időtartama (előkezelés; utókezelés).

Vizsgálati körülmények (2); *a vegyi anyaggal történő kezelés:*

— a sugárzás jelenléte vagy hiánya esetén használt vizsgálati vegyianyag-koncentrációk kiválasztásának magyarázata,

— a vizsgált vegyi anyag korlátozott oldhatósága és a citotoxicitás hiánya esetén: a vizsgált legnagyobb koncentráció magyarázata,

— a kezelési közeg típusa és összetétele (puffersóoldat),

— a vegyi kezelés időtartama.

Vizsgálati körülmények (3); *besugárzás:*

— a használt fényforrás kiválasztásának magyarázata,

▼B

— a fényforrás és a sugárzásmérő gyártója és típusa,

— a fényforrás spektrális irradiancia jellemzői,

— a használt szűrő(k) átviteli és abszorpciós jellemzői,

— a sugárzásmérő jellemzői és kalibrálásának részletei,

— a fényforrás távolsága a vizsgálati rendszertől,

— UVA-sugárzás ezen a távolságon, mW/cm^2-ben kifejezve,

— az UV/látható fénynek való expozíció időtartama,

— UVA-dózis (irradiancia × idő), J/cm^2-ben kifejezve,

— a sejtkultúrák besugárzás alatti, valamint az ezzel párhuzamosan sötétben tartott sejtkultúrák hőmérséklete.

Vizsgálati körülmények (4); *neutrálvörös életképességi vizsgálat:*

— a neutrálvörös kezelési közeg összetétele,

— a neutrálvörös inkubáció időtartama,

— inkubációs körülmények (CO_2-koncentráció; hőmérséklet; páratartalom),

— a neutrálvörös kivonásának körülményei (kivonó oldat; időtartam),

— a neutrálvörös optikai sűrűségének leolvasásához használt spektrofotométer hullámhossza,

— második hullámhossz (referencia), ha használják,

— a spektrofotométer üreslap-tartalma, ha használják.

Eredmények:

— a vizsgált vegyi anyag minden egyes koncentrációja esetén a sejt életképessége a párhuzamos kontrolloldószerek átlagos életképességének százalékában kifejezve,

— koncentráció-válasz görbék (a vizsgált vegyi anyag koncentrációja függvényében a relatív sejtéletképesség), amelyet párhuzamosan végzett +Irr és –Irr kísérletek során nyertek,

— a koncentráció-válasz görbék elemzése: ha lehetséges, az IC_{50} (+Irr) és IC_{50} (–Irr) kiszámítása,

— a sugárzás jelenlétében és hiányában nyert két koncentráció-válasz görbe összehasonlítása vagy a fotoirritációs tényező (PIF) vagy az átlagos fényhatás (MPE) kiszámításával,

— a vizsgálat elfogadási kritériumai; párhuzamos kontrolloldószer,

— a sugárkezelt és nem sugárkezelt sejtek abszolút életképessége (a neutrálvörös kivonat optikai sűrűsége),

— a negatív kontroll és a kontrolloldószer történeti adatai; átlagértékek és szórások,

— a vizsgálat elfogadási kritériumai; párhuzamos pozitív kontroll,

▼B

— a pozitív kontrollanyag IC_{50} (+Irr) és IC_{50} (–Irr), valamint PIF/MPE értéke,

— a pozitív kontrollanyagokra vonatkozó történeti adatok: IC_{50} (+Irr) és IC_{50} (–Irr), valamint PIF/MPE; átlagértékek és szórások.

Az eredmények értékelése.

Összefoglaló megállapítások.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(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 ENV7EHS, 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.

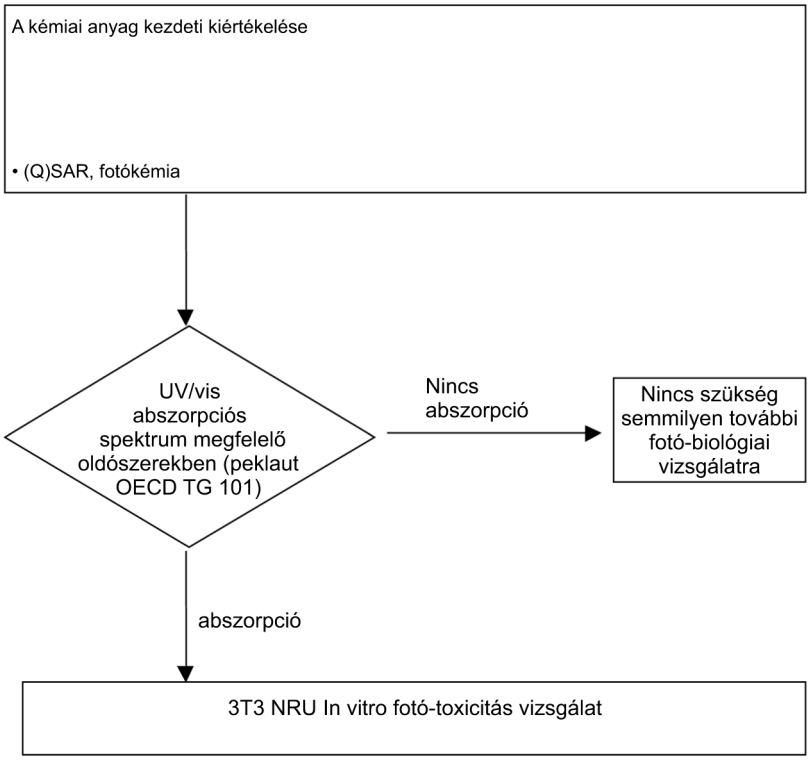
(19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445–462.

(20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

1. FÜGGELÉK

A 3T3 NRU PT szerepe a vegyi anyagok fototoxicitás-vizsgálatának szekvenciális megközelítésében

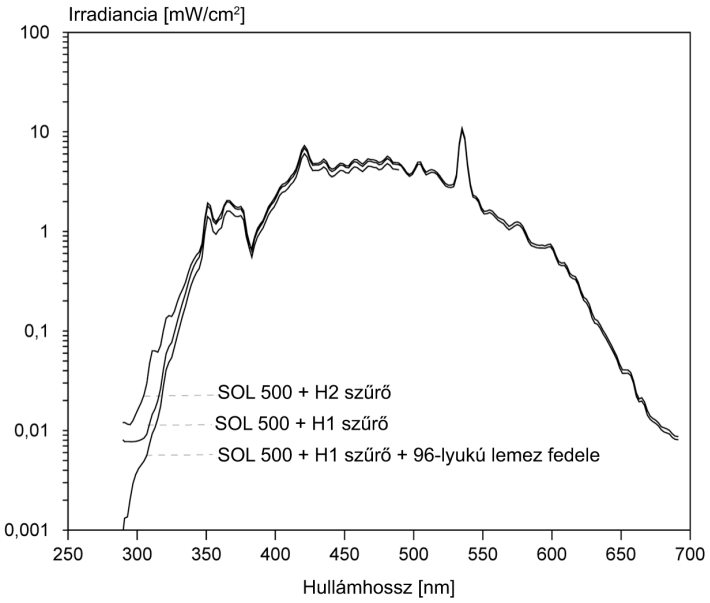


▼B

2. FÜGGELÉK

1. ábra

A szűrtnapfény-szimulátor spektrális energiaeloszlása



(lásd az 1.4.1.5. szakasz második bekezdését)

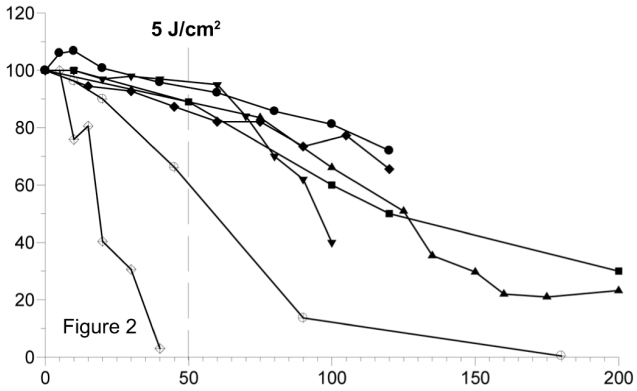
Az 1. ábrán példa található a szűrtnapfény-szimulátor elfogadható spektrális irradianciaeloszlására. A fényforrás a 3T3 NRU PT validálási vizsgálata során használt bevont fém-halogenid forrás (6) (8) (17). A görbén megfigyelhető a két különböző szűrő hatása és a 96 lyukú sejtkultúralemez fedelének további szűrőhatása. A H2 szűrőt csak olyan vizsgálati rendszerrel használták, amely nagyobb UVB-értéket is képes elviselni (bőrmodellvizsgálat és vörösvérsejt fotohemolízisének vizsgálata). A 3T3 NRU-PT-ben a H1 szűrőt használták. Az ábra azt mutatja, hogy a lemezfedél további szűrőhatását főként az UVB-tartományban figyelték meg, és ez még elég UVB-t hagyott a sugárzási spektrumban ahhoz, hogy aktiválja a jellegzetesen az UVB-tartományban abszorbeáló vegyi anyagokat, mint amilyen az amiodaron (lásd az 1. táblázatot).

▼B

2. ábra

Balb/c 3T3 sejtek sugárérzékenysége (az UVA-tartományban mérve)

Sejtéletképesség (% a sötét kontrollok neutrálvörös felvétele)



sugárzás időtartama (perc)

(10 perc = 1 joule UVA/cm²)

(lásd az 1.4.1.5.2. szakasz második bekezdését, valamint az 1.4.2.2.1. és az 1.4.2.2.2. szakaszt)

A Balb/c 3T3 sejteknek a 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálat validálási vizsgálatában használt napfényszimulátorral történő sugárzás hatása nyomán kialakuló érzékenysége az UVA-tartományban mérve. Az ábra a prevalidálási vizsgálat során 7 különböző laboratóriumban kapott eredményeket mutatja (1). Míg a két üres szimbólumú görbét öreg sejtekkel nyerték (nagy passzázsszám), amelyeket új sejttörzsekkel kellett helyettesíteni, addig a satírozott szimbólumú görbék olyan sejteket mutatnak, amelyeknek a sugártoleranciája elfogadható.

Ezekből az adatokból származtatták az 5 J/cm^2 legnagyobb nem citotoxikus sugárdózist (függőleges szaggatott vonal). A vízszintes szaggatott vonal emellett az 1.4.2.2. szakaszban megadott maximális elfogadható sugárhatást mutatja.

▼M3

B.42. BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: LOKÁLIS NYIROKCSOMÓ-VIZSGÁLATI MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. Az OECD vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozó iránymutatásait és az ezeken alapuló uniós vizsgálati módszereket időnként felülvizsgálják a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és állatjóléti megfontolások fényében. A bőrszenzibilizáció egereken történő meghatározására irányuló eredeti vizsgálati módszert, a lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer (LLNA; az OECD 429. vizsgálati iránymutatása; e melléklet B.42. fejezete) már korábban elfogadásra került (1). Az LLNA hitelesítésére vonatkozó információk és az ezzel kapcsolatos munka áttekintése a (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11) hivatkozásban található. Az aktualizált LLNA a tapasztalatok és tudományos adatok értékelésén alapul (12). Ez a második olyan vizsgálati módszer, amely a vegyi anyagok (anyagok és keverékek) bőrszenzibilizációt okozó hatásának állatokon történő vizsgálatára szolgál. A másik vizsgálati módszer (vagyis az OECD 406. vizsgálati iránymutatása; e melléklet B.6. fejezete) tengerimalacon végzett vizsgálatokat alkalmaz, nevezetesen a tengerimalac-maximizációs módszert és a Bühler-vizsgálatot (13). Az állatjólét szempontjából az LLNA előnyösebb a B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában szereplő módszereknél (13). Ez az aktualizált LLNA vizsgálati módszer több olyan teljesítményszabványt (1. függelék) foglal magában, amelyek alkalmazhatók az LLNA-hoz funkcionálisan és módszertanilag hasonló új és/vagy módosított vizsgálati módszerek hitelesítési státusának az OECD 34. iránymutatásában foglalt elvekkel összhangban történő értékeléséhez (14).

2. Az LLNA a bőrszenzibilizáció indukciós fázisát vizsgálja, és a dózis-válasz vizsgálathoz alkalmazható kvantitatív adatokat szolgáltat. Megjegyzendő, hogy azok az enyhén/közepesen szenzibilizáló anyagok, amelyeket a tengerimalac-vizsgálati módszerekhez pozitív kontrollanyagként ajánlanak (vagyis B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (13), az LLNA-nál is alkalmazhatók (6) (8) (15). E vizsgálati módszer esetében lehetőségként ismertetésre kerül a csökkentett LLNA (rLLNA) módszer is, amelyet akár 40 %-kal kevesebb állattal is el lehet végezni (16) (17) (18). Az rLLNA olyan esetekben alkalmazható, amikor a szabályozási előírásoknak megfelelően igazolni kell a feltételezett negatív bőrszenzibilizáló hatást, azzal a feltétellel, hogy a vizsgálati módszer e leírásában foglaltaknak megfelelően az LLNA protokolljában szereplő összes egyéb előírást betartják. A negatív eredmény feltételezésének a 4. bekezdésben leírtak szerint az összes rendelkezésre álló adaton kell alapulnia. Az rLLNA módszer alkalmazása előtt egyértelműen meg kell indokolni a módszert alkalmazását, és ismertetni kell az alkalmazását alátámasztó tudományos magyarázatot. Amennyiben az rLLNA a várakozásokkal ellentétben pozitív vagy kétes eredményt ad, az eredmény értelmezéséhez és tisztázásához további vizsgálatokra lehet szükség. Az rLLNA nem használható bőrszenzibilizáló vizsgált anyagok veszélyességének meghatározását célzó vizsgálatokhoz abban az esetben, ha dózis-válasz információra van szükség, mint például az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendelet és az ENSZ vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszere szerinti alkategóriákba sorolás esetében.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

3. Az alkalmazott fogalmak meghatározása a 2. függelékben található.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

4. Az LLNA alternatív módszert jelent a lehetséges bőrszenzibilizáló vegyi anyagok meghatározására. Ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy minden esetben az LLNA-t kell alkalmazni a tengerimalac-vizsgálat (lásd B.6. fejezet, az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (14) helyett, inkább azt, hogy ez a vizsgálati módszer ugyanolyan hasznos, és olyan alternatív módszerként alkalmazható, amely esetében a pozitív és negatív eredmények általában már nem igényelnek további megerősítést. A vizsgálat elvégzése előtt a vizsgáló

▼M3

laboratóriumnak a vizsgált anyagról rendelkezésre álló összes adatot figyelembe kell vennie. Ezen információk közé tartozik a vizsgált anyag azonosítása, kémiai szerkezete, fizikai-kémiai tulajdonságai, valamint a vizsgált anyaggal korábban végzett *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei és a szerkezetileg rokon vegyi anyagok toxikológiai adatai is. Mindezen információk figyelembevételével dönthető el, hogy a LLNA alkalmazható-e az adott anyag esetében (tekintve, hogy bizonyos vegyianyag-típusoknál inkompatibilitás áll fenn az LLNA-val (lásd az (5) bekezdést), és milyen dózist célszerű választani a vizsgálatokhoz.

5. Az LLNA *in vivo* módszer, következésképpen nem küszöbölhető ki vele az állatok felhasználása az allergiás kontakt szenzibilizáló hatás vizsgálata során. Ugyanakkor csökkenteni lehet vele az e célra felhasznált állatok számát. Az LLNA emellett az állatok kontakt szenzibilizációs vizsgálatok során történő felhasználásának módját tekintve jelentősen kíméletesebb (kevesebb fájdalommal és szenvedéssel jár). Az LLNA azon immunológiai történések figyelmes vizsgálatán alapul, amelyeket a vegyi anyagok a szenzibilizáció indukciós fázisában stimulálnak. A tengerimalac-vizsgálattól (B.6.; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (13) eltérően az LLNA-hoz nincs szükség indukált bőr-hiperszenzitivitási reakciók előidézésére. A tengerimalac-maximizációs vizsgálattal ellentétben nincs szükség adjuváns alkalmazására sem (13). Az LLNA alkalmazásával tehát csökkenthető az állatokat érő fájdalom és szenvedés mértéke. Az LLNA-nak a B.6. pont és az OECD 406. vizsgálati iránymutatása szerinti vizsgálatokkal szembeni előnyei ellenére el kell ismerni, hogy a módszernek vannak olyan korlátai (pl. az LLNA hamis negatív eredményei egyes fémek, vagy hamis pozitív eredményei bizonyos bőrirritáló anyagok, [például bizonyos felületaktív szerek] esetében (19) (20), illetve a vizsgált anyag oldhatósága), amelyek szükségessé teszik a B.6. pont és az OECD 406. vizsgálati iránymutatása szerinti vizsgálatok alkalmazását (21). Továbbá az olyan kémiai osztályok vagy funkcionális csoportot tartalmazó anyagok, amelyek lehetséges zavaró tényezőként szerepelnek (21) szükségessé tehetik a tengerimalac-vizsgálatok (vagyis a B.6. pont; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) használatát (13). Emellett a hitelesítési adatbázis hiányosságai miatt, amely elsősorban peszticid készítmények adataiból áll, az LLNA a tengerimalac-vizsgálatnál nagyobb valószínűséggel ad pozitív eredményt az ilyen típusú vizsgált anyagok esetében (22). A készítmények vizsgálatakor azonban, az LLNA megfelelő működésének bizonyításához meg lehet fontolni az ismert eredménnyel rendelkező, hasonló anyagok referenciaanyagként történő bevonását is (lásd 16. bekezdés). E meghatározott hiányosságokon kívül, az LLNA bármilyen anyag vizsgálatára megfelelő, kivéve, ha ezek az anyagok olyan tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek befolyásolják az LLNA pontosságát.

A VIZSGÁLAT ELVE

6. Az LLNA módszer hátterében az az alapelv áll, hogy a szenzibilizáló anyagok elsődleges limfocitaproliferációt indukálnak a vizsgált anyag alkalmazási területének nyirokelvezetéséről gondoskodó nyirokcsomókban. Ez a proliferáció arányos az alkalmazott allergén dózisával és erősségével, valamint egyszerű módszert biztosít a szenzibilizáció kvantitatív méréséhez. A proliferációt úgy mérik, hogy a vizsgálati csoportokban mért átlagos proliferációt összehasonlítják a vivőanyaggal kezelt csoportban mért proliferációval. Meghatározzák az egyes kezelt csoportokban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportokban mért átlagos proliferáció arányát, amelyet stimulációs indexnek (SI) neveznek, és amelynek legalább $\geq$ 3-nak kell lennie ahhoz, hogy indokolt legyen a vizsgált anyag potenciális bőrszenzibilizáló anyagként történő besorolása. Az itt ismertetett eljárások *in vivo* radioaktív anyaggal történő jelölésen alapulnak, amellyel mérhető az elvezető aurikuláris nyirokcsomókban lévő proliferáló sejtek számának növekedése. A proliferációs sejtek számának vizsgálatára azonban más végpontok is alkalmazhatók, feltéve, hogy a PS követelmények maradéktalanul teljesülnek (1. függelék).

▼M3

A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

7. Ehhez a vizsgálathoz az egér a választandó faj. A CBA/Ca vagy CBA/J törzsbe tartozó, fiatal felnőtt nullipara és nem vemhes nőstény egereket kell használni. A vizsgálat elején az állatok korának 8–12 hétnek kell lennie, az állatok testtömege között az eltérésnek minimálisnak kell lennie, és a testtömeg nem haladhatja meg az átlagos testtömeg 20 %-át. Ha elegendő adat áll rendelkezésre arra nézve, hogy az LLNA módszerrel kapott válaszreakcióban nincsenek jelentős törzs- és/vagy ivarspecifikus különbségek, akkor más törzsek, illetve hím állatok is alkalmazhatók.

Az állatok tartásának és etetésének körülményei

8. Az egereket csoportosan kell tartani (23), kivéve, ha az egyedenkénti tartásra megfelelő tudományos indok merül fel. A kísérleti állatok tartásául szolgáló helyiség hőmérsékletének 22 °C ± 3 °C-nak kell lennie. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem haladhatja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos, 12 órás sötét periódusok váltakozásával. Az etetéshez a szokásos laboratóriumi takarmány alkalmazható korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

Az állatok előkészítése

9. Az állatokat véletlenszerűen választják ki, majd egyedi azonosítóval látják el (viszont az állat fülén semmiféle azonosító nem alkalmazható), és a kezelés megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben tartják őket, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez. A kezelés megkezdése előtt minden állatot megvizsgálnak, hogy meggyőződjenek arról, nincs rajtuk látható bőrsérülés.

A dózisok előkészítése

10. A szilárd halmazállapotú vegyi anyagokat az egér fülén történő alkalmazás előtt oldószerben/vivőanyagban kell feloldani vagy szuszpendálni, és szükség esetén hígítani kell. A folyadék halmazállapotú vegyi anyagokat hígítatlanul vagy az adagolás előtt hígított formában lehet alkalmazni. A nem oldható vegyi anyagokat, például az orvosi eszközökben általánosan előforduló anyagokat megfelelő oldószerben történő agresszív extrakciónak kell kitenni, hogy a vizsgálat során az egér fülén való alkalmazás előtt az összes kivonható összetevőt feltárjuk. A vizsgált anyagokat naponta kell elkészíteni, kivéve, ha stabilitási adatok igazolják, hogy a tárolás elfogadható.

A megbízhatóság ellenőrzése

11. A vizsgálat megfelelő teljesítményének megfelelő és reprodukálható szenzitivitással adott válaszreakciókkal történő igazolására pozitív kontrollanyagokat (PK) alkalmaznak; ezek olyan szenzibilizáló tesztanyagok, amelyek esetében a válaszreakció mértéke pontosan meghatározott. Pozitív kontroll párhuzamos vizsgálata ajánlott, mivel ez igazolja, hogy a laboratórium megfelelő szakértelemmel végzi az egyes vizsgálatokat, és lehetővé teszi a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság és összehasonlíthatóság értékelését. Néhány szabályozó hatóság szintén előírja a pozitív kontroll minden vizsgálat során történő alkalmazását, ezért az

▼M3

LLNA módszer elvégzése előtt ajánlott egyeztetni az illetékes hatóságokkal. Ennek megfelelően javasolt a pozitív kontroll rutinszerű párhuzamos vizsgálata, hogy elkerülhetőek legyenek az olyan további állatkísérletek, amelyeket a pozitív kontrollt csak időszakosan alkalmazó laboratórium az előírásoknak való megfelelés érdekében végezne (lásd a 12. bekezdést). A pozitív kontrollnak az LLNA módszerrel olyan expozíciós szint mellett kell pozitív válaszreakciót adnia, amely a negatív kontrollcsoporthoz (NK) képest várhatóan legalább 3-mal növeli a stimulációs indexet (SI). A pozitív kontroll dózisát úgy kell megválasztani, hogy ne okozzon túlzott bőrirritációt vagy szisztémás toxicitást, és az indukció reprodukálható, de ne túl nagymértékű legyen (tehát SI > 20 már túlzottnak tekinthető). Az előnyben részesítendő pozitív kontrollanyagok a 25 %-os hexil-cinnemaldehid (Chemical Abstracts Service [CAS] szám: 101-86-0) aceton: olívaolaj (4:1, v/v) keverékében és 5 %-os merkaptobenzotiazol (CAS-szám: 149-30-4) N,N-dimetilformamidban (lásd 1. függelék, 1. táblázat). Adódhatnak olyan körülmények, amelyek fennállásakor, megfelelő indoklás esetén a fenti kritériumoknak megfelelő más pozitív kontrollanyagok is alkalmazhatók.

12. Bár ajánlott a pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata, lehetnek azonban olyan helyzetek, amikor a pozitív kontroll időszakos (például legalább 6 havonta végzett) vizsgálata elfogadható lehet az olyan, az LLNA vizsgálatot rendszeresen (vagyis legalább havonta egyszeri gyakorisággal) végző laboratóriumok esetében, amelyek rendelkeznek a pozitív kontrollok igazolt, historikus adatbázisával, és ezzel bizonyítható, hogy a laboratórium a pozitív kontrollokkal képes reprodukálható és pontos eredményeket előállítani. Az LLNA módszerben való jártasság alátámasztható a pozitív kontrollal megfelelő időszakon belül (kevesebb mint egy éve) végzett legalább 10 független vizsgálat során kapott következetesen pozitív eredményekkel.
13. Pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata minden alkalommal szükséges, valahányszor az LLNA vizsgálat módszerében változtatást hajtanak végre (például a képzett személyzet, a vizsgálati eljárás során használt anyagok és/vagy reagensek, a vizsgálati eszközök, vagy a kísérleti állatok beszerzési forrásának megváltoztatása), és ezeket a változásokat dokumentálni kell a laboratóriumi jelentésekben. Figyelembe kell venni, hogy ezek a változtatások mennyiben befolyásolják a korábban létrehozott historikus adatbázis megfelelőségét, és el kell dönteni, hogy szükséges-e új historikus adatbázis felállítása a pozitív kontroll eredményei következetességének dokumentálása érdekében.
14. A vizsgálatot végző személyeknek tisztában kell lenniük azzal, hogy amennyiben a párhuzamos vizsgálat helyett a pozitív kontrollok időszakos vizsgálata mellett döntenek, ez hatással lehet a pozitív kontrollok időszakos vizsgálatai közötti időszakokban, párhuzamos pozitív kontroll vizsgálata nélkül előállított negatív vizsgálati eredmények megfelelőségére és elfogadhatóságára. Ha például a pozitív kontrollal végzett időszakos vizsgálat álnegatív eredményt adott, akkor megkérdőjelezhetők azok a negatív eredmények, amelyek az utolsó elfogadható eredményű és az elfogadhatatlan eredményű időszakos pozitív kontroll vizsgálat között eltelt időszakban keletkeztek. Az ilyen következmények jelentőségét körültekintően mérlegelni kell annak eldöntésekor, hogy pozitív kontrollokat párhuzamosan vagy csak időszakosan vizsgáljanak-e. Szintén megfontolandó a kevesebb állat használata a párhuzamos pozitív kontrollcsoportban, amennyiben ez tudományosan indokolt, és a laboratóriumra specifikus historikus adatok alapján a laboratórium igazolja, hogy megfelelő a kevesebb egér használata (12).
15. Bár a pozitív kontrollt olyan vivőanyagban kell vizsgálni, amelyről ismert, hogy következetes válaszreakciót vált ki (például aceton:olívaolaj; 4:1, v/v arányú keveréke), lehetnek olyan szabályozási helyzetek, amikor nem szokványos vivőanyagokban (klinikailag/kémiailag releváns készítmény) történő vizsgálat elvégzésére is szükség van (24). Amennyiben a párhuzamos pozitív kontrollt a vizsgált anyagétól eltérő vivőanyagban vizsgálják, akkor a párhuzamos pozitív kontrollal együtt egy külön vivőanyagos kontrollt is vizsgálni kell.
16. Azokban az estekben, amikor egy bizonyos vegyi csoportba tartozó vizsgált anyagokat vagy a válaszreakciók tartományát értékelik, szintén hasznos lehet a referenciaanyagok alkalmazása annak igazolására, hogy a vizsgálati módszer megfelelően működik az ilyen típusú vizsgált anyagok bőrszenzibilizáló hatásának kimutatására. A megfelelő referenciaanyagoknak a következő tulajdonságokkal kell rendelkezniük:
    - szerkezeti és funkcionális hasonlóság a vizsgált anyag csoportjával,
    - ismert fizikai/kémiai tulajdonságok,
    - az LLNA módszerrel kapott alátámasztó adatok,
    - egyéb állatmodellekből és/vagy emberből származó alátámasztó adatok.

▼M3

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

Az állatok száma és a dózisszintek

17. Minden dóziscsoportban legalább négy állatot kell használni, és a vizsgált anyagból legalább három különböző koncentrációt, továbbá párhuzamos negatív kontrollcsoportot, amelyet csak a vizsgált anyaghoz használt vivőanyaggal kezelnek, valamint egy pozitív kontroll csoportot kell alkalmazni (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11-14. bekezdésben foglaltakat). Megfontolandó a pozitív kontroll többféle dózisának vizsgálata, különösen, ha a pozitív kontroll vizsgálatát időszakosan végzik. A kontrollcsoportban lévő állatokkal ugyanúgy kell bánni és dolgozni, mint a kezelt csoportokban lévőkkel, azzal a kivétellel, hogy az állatokat nem kezelik a vizsgált anyaggal.

18. A dózist és a vivőanyagot a (3) és (5) számú hivatkozásokban megadott ajánlások alapján kell kiválasztani. Az egymás utáni dózisok kiválasztása általában megfelelő koncentrációsorból, például 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % stb. történik. Az alkalmazott koncentrációsort megfelelő tudományos megfontolások alapján kell kiválasztani. A három egymás utáni koncentráció kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált anyagról esetlegesen rendelkezésre álló valamennyi toxikológiai információt (például akut toxicitás és bőrirritáció), valamint szerkezeti és fizikokémiai adatot, hogy a legmagasabb koncentrációval a lehető legnagyobb expozíciót idézzük elő, amely még nem okoz szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű lokális bőrirritációt (3) (25). Ilyen jellegű információk hiányában szükséges lehet a megelőző előszűrő vizsgálat (lásd a 21-24. bekezdést).

19. A vivőanyagnak nem szabad megzavarnia vagy befolyásolnia a vizsgálat eredményét, és aszerint kell kiválasztani, hogy a vizsgált anyag oldhatósága a lehető legnagyobb koncentráció elérése érdekében maximális legyen, ugyanakkor a vizsgált anyag felvitelére alkalmas oldatot/szuszpenziót kapjunk. A javasolt vivőanyagok az aceton:olívaolaj (4:1, v/v) keveréke, N,N-dimetilformamid, metil-etil-keton, propilén-glikol és dimetil-szulfoxid (19), de megfelelő tudományos indoklás esetén más vivőanyagok is alkalmazhatók. Bizonyos esetekben további kontrollként szükséges lehet valamely klinikai szempontból releváns oldószer használata, vagy annak a kereskedelmi formulának az alkalmazása, amelyben a vizsgált anyagot forgalomba hozzák. Különösen vigyázni kell arra, hogy megfelelő szolubilizáló szerek (pl. 1 % Pluronic® L92) alkalmazásával a hidrofil vizsgált anyagokat olyan vivőanyagrendszerbe építsük be, amely benedvesíti a bőrt, de nem folyik le azonnal. A teljesen vizes alapú vivőanyagokat tehát kerülni kell.

20. A nyirokcsomók egyedenként történő feldolgozása lehetővé teszi az egyedek közötti variabilitás, valamint a vizsgált anyaggal és a vivőanyaggal kezelt csoport eredményeinek statisztikai összehasonlítását (lásd a 35. bekezdést). Emellett akkor lehet értékelni, hogy lehetséges-e csökkenteni a pozitív kontrollcsoportban lévő egerek számát, ha az egyedi állatokra vonatkozóan gyűjtünk adatokat (12). Ezen túlmenően, egyes szabályozó hatóságok is megkövetelik az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtést. Egyes szabályozó hatóságok azonban esetleg elfogadhatónak tartják az állatokra vonatkozó összesítve gyűjtött adatokat, és ezekben az esetekben, a felhasználók eldönthetik, hogy egyedenként vagy összesítve kívánják-e gyűjteni a kísérleti állatokra vonatkozó adatokat.

Előszűrő vizsgálat

21. A legmagasabb vizsgálandó dózis meghatározását lehetővé tevő információ hiányában (lásd a 18. bekezdést) az LLNA módszerhez alkalmazandó megfelelő dózisszint megállapítása érdekében előszűrő vizsgálatot kell végezni. Az előszűrő vizsgálat célja, hogy támpontot adjon az LLNA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózis kiválasztásához, amennyiben a szisztémás toxicitást (lásd a 24. bekezdést) és/vagy nagyfokú bőrirritációt (lásd 23. bekezdés) okozó koncentrációra vonatkozó információk nem állnak rendelkezésre. Folyadékok esetében a legmagasabb vizsgált dózisnak 100 %-os koncentrációnak kell lennie, szilárd anyagok vagy szuszpenziók esetében pedig a lehetséges maximális koncentrációnak.

▼M3

22. Az előszűrő vizsgálatot a fő LLNA vizsgálathoz hasonló körülmények között kell elvégezni, eltekintve attól, hogy a nyirokcsomó proliferációt nem kell értékelni, valamint dóziscsoportonként kevesebb állat használható. Dóziscsoportonként egy vagy két állat javasolt. Az egereket a szisztémás toxicitás, illetve az alkalmazás helyén fellépő helyi irritáció jeleinek szempontjából naponta megfigyelik. A testtömeget a vizsgálat előtt és az állat exterminálása előtt is (6. nap) feljegyzik. A bőrpírt az egerek mindkét fülén vizsgálják és pontozzák az 1. táblázat (25) szerint. A fülvastagság értékeit egy vastagságmérővel (például digitális mikrométer, vagy Peacock Dial vastagságmérő) állapítják meg az 1. napon (az adagolás előtt), a 3. napon (hozzávetőleg 48 órával az első dózis után), valamint a 6. napon. A 6. napon a fülvastagságot ezen kívül a fülből lyukasztással eltávolított szövet tömegének meghatározásával is meg lehet állapítani, amit az állat exterminálása után kell elvégezni. Nagyfokú helyi bőrirritációnak minősül a legalább ≥ 3-as pontszámú bőrpír és/vagy legalább ≥ 25 %-os fülvastagság-növekedés a vizsgálat bármely napján (26) (27). A fő LLNA vizsgálathoz azt a dózist kell maximális dózisként választani, amely az előszűrés során alkalmazott koncentrációsorban (lásd a 18. bekezdést) a szisztémás toxicitást és/vagy nagyfokú helyi bőrirritációt okozó koncentrációnál eggyel alacsonyabb.

1. táblázat

Bőrpír (erythema) pontszámai

Megfigyelés	Pontszám
Nincs erythema	0
Nagyon enyhe erythema (alig észlelhető)	1
Jól körülírt erythema	2
Közepes-súlyos erythema	3
Súlyos (céklavörös elszíneződés), pörkképződéig terjedő erythema, amely lehetetlenné teszi az erythema besorolását	4

23. A 25 %-os fülvastagság-növekedésen felül (26) (27), a bőrirritáló anyagok LLNA módszerrel végzett kimutatásához a kezelt állatok fülvastagságának kontrollcsoporthoz viszonyított statisztikailag szignifikáns növekedését is használják (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Noha 25 % alatti fülvastagság esetén is előfordulhat statisztikailag szignifikáns növekedés, a nagyfokú irritációval azonban ezt különösen nem hozták összefüggésbe (30) (32) (33) (34).

24. Az integrált értékelés részeként alkalmazva a következő klinikai tünetek jelezhetnek szisztémás toxicitást (35) (36), és ezáltal kijelölhetik a fő LLNA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózist: az idegrendszer működésében bekövetkező változások (például piloerekció, ataxia, tremorok és görcsrohamok); a viselkedésben bekövetkező változások (például agresszivitás, a tisztálkodási tevékenységekben bekövetkező változás, az aktivitási szint jelentős változása); a légzési mintázat változása (például a légvételek gyakoriságában és az intenzitásában bekövetkező változás, úgymint dyspnoe, zihálás és szörtyzörejek), valamint változások az táplálék- és vízfogyasztásban. Az értékelés során emellett figyelembe kell venni a letargia és/vagy reakciókészség hiányának jeleit, valamint az enyhénél és pillanatnyinál fokozottabb fájdalom vagy szenvedés bármilyen klinikai tünetét, az > 5 %-nál nagyobb arányú testtömegcsökkenést az 1. naptól a 6. napig tartó időszakban, valamint a mortalitást. Az elhullásközeli állapotban lévő, egyértelműen fájdalmat érző vagy súlyos, tartós szenvedés jeleit mutató állatokat humánus módon exterminálni kell (37).

▼M3

A fő vizsgálat kísérleti ütemterve

25. A vizsgálat kísérleti ütemterve a következő:

— *1. nap:* Külön meg kell határozni, és fel kell jegyezni mindegyik állat testtömegét és az esetleges klinikai megfigyeléseket. Vigyünk fel 25 µl térfogatú, megfelelő hígítású vizsgált anyagot, valamint a vivőanyagot önmagában vagy pozitív kontrollt (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11–15. bekezdésekben foglaltakat) a fülek dorzális oldalára.

— *2. és 3. nap:* Ismételjük meg az 1. napon elvégzett felviteli eljárást.

— *4. és 5. nap:* Nincs kezelés.

— *6. nap:* Jegyezzük fel az állatok testtömegét. Injekciózzunk 250 µl steril 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) ^{3}H-metil-timidint tartalmazó sós foszfátpuffert (PBS) a kezelt és kontrollegerek farokvénájába. Használhatunk ehelyett 250 µl, steril 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I-jóddezoxiuridint és 10^{-5} M fluordezoxiuridint tartalmazó PBS-t is, szintén az egerek farokvénájába injektálva. Öt órával később exterminálják az állatokat. Mindegyik kísérleti csoportban az állatok füléből vágjuk ki a kezelt terület nyirokelvezetéséről gondoskodó füli nyirokcsomókat, és minden egyes állat esetében egyenként helyezzük PBS-be (egyedi állatokon alapuló megközelítés); vagy tegyük a mintákat kísérleti csoportonként egy PBS-t tartalmazó edénybe (kezelési csoportokon alapuló összevont megközelítés). A nyirokcsomók azonosításának és preparálásának részletei és az ehhez kapcsolódó ábrákat a (12) hivatkozásban találhatók. A helyi bőrreakció fő vizsgálatban történő további monitorozásához olyan további paramétereket lehet belevenni a vizsgálati protokollba, mint például a bőrpír pontozása vagy a fülvastagság mérése (akár vastagságmérővel, akár elölés utáni füldarabsúly-meghatározással).

A sejtszuszpenziók elkészítése

26. Az egyedi állatokon alapuló vagy kezelési csoporton alapuló összevont megközelítést alkalmazva, az egyes állatokból két oldalról vett nyirokcsomósejtekből (LNC) álló egysejtszuszpenziókat kell előállítani a sejtek 200 mikrométeres lyukméretű rozsdamentes acélból készült fémhálón keresztül vagy egyéb elfogadható módszerrel történő óvatos mechanikai szétválasztásával. A nyirokcsomósejteket nagy feleslegben lévő PBS-sel kétszer át kell mosni, majd a DNS-t 4 °C-on 18 órán át, 5 %-os triklórecetsavval (TCA) precipitálni (3). A pelleteket vagy 1 ml TCA-ban újra kell szuszpendálni és 10 ml szcintillációs folyadékot tartalmazó szcintillációs fiolákba (^{3}H-számlálás) áttenni, vagy közvetlenül gammaszámláló csövekbe (^{125}I-számlálás) kell átrakni.

A sejtproliferáció meghatározása (beépült radioaktivitás)

27. A ^{3}H-metil-timidin beépülését a β-szcintillációs beütésszámmal mérik, percenkénti bomlás (DPM) egységekben. A ^{125}I-jóddezoxiuridin beépülését a ^{125}I beütésszámával mérik, és ugyancsak DPM-ben fejezik ki. Az alkalmazott megközelítéstől függően a beépülést DPM/egér (egyedi állatokon alapuló megközelítés) vagy DPM/kezelési csoport (kezelési csoporton alapuló összevont megközelítés) egységben fejezik ki.

Csökkentett LLNA (rLLNA)

28. Bizonyos esetekben, amikor a szabályozási előírásoknak megfelelően igazolni kell a bőrszenzibilizáló képesség feltételezett hiányát, opcionális rLLNA protokoll alkalmazható (16) (17) (18), amelyhez kevesebb állatot kell felhasználni, azzal a feltétellel, hogy a vizsgálati módszer e leírásában foglalt, az LLNA protokolljában szereplő összes egyéb előírást betartják. Az rLLNA módszer alkalmazása előtt egyértelműen meg kell indokolni annak alkalmazását, és ismertetni kell az alkalmazást alátámasztó tudományos magyarázatot. Amennyiben a módszer pozitív vagy kétes eredményt ad, további vizsgálatokra lehet szükség az eredmény értelmezéséhez és tisztázásához.

▼M3

29. Az LLNA és az rLLNA vizsgálati módszerek protokolljai között az egyetlen különbség a dóziscsoportok kisebb száma az rLLNA esetében, ennélfogva az rLLNA módszer nem szolgáltat adatokat a dózis-válasz összefüggésre vonatkozóan. Az rLLNA módszer ezért nem alkalmazható olyan esetekben, amikor a dózis-válasz összefüggésre vonatkozó információkra van szükség. A több dózist alkalmazó LLNA módszerhez hasonlóan az rLLNA módszer során a vizsgált anyagból alkalmazott maximális koncentrációt úgy kell megválasztani, hogy az ne idézzen elő az egérnél kifejezett szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű helyi bőrirritációt (lásd a 18. bekezdést).

MEGFIGYELÉSEK

Klinikai megfigyelések

30. Naponta legalább egyszer minden egérnél meg kell vizsgálni az alkalmazás helyén kialakuló lokális vagy szisztémás toxicitás esetleges tüneteit. Minden megfigyelést szisztematikusan fel kell jegyezni minden egyes egér esetében, egyedi adatsor felvételével. A monitoring tervnek tartalmaznia kell azon kritériumokat, amelyek alapján azonnal azonosíthatóak az eutanáziát igénylő, szisztémás toxicitást, kiterjedt helyi bőrirritációt vagy bőrkorróziót mutató egerek (37).

Testtömeg

31. Ahogyan az a 25. bekezdésben szerepel, az egyes állatok testtömegét a vizsgálat kezdetén, valamint a humánusan történő exterminálás tervezett időpontjában kell megmérni.

AZ EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

32. Az egyes kezelési csoportokra vonatkozó eredményeket stimulációs indexben (SI) fejezzük ki. Az egyedi állatokon alapuló megközelítés alkalmazása esetén, akkor az SI kiszámítása úgy történik, hogy a vizsgált anyaggal kezelt egyes csoportokban és a pozitív kontrollcsoportban kapott állatonkénti átlagos DPM-értéket el kell osztani az oldószerrel/vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport átlagos állatonkénti DPM-értékével. A vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportok átlagos SI-értéke tehát 1. A kezelési csoportokon alapuló összevont megközelítésének alkalmazása esetén az SI-t úgy kapják meg, hogy az egyes kezelési csoportokra eső összevont radioaktív beépülést elosztják a vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportra jutó összevont beépüléssel, ami megadja az átlagos SI-t.

33. A válaszreakciót akkor lehet pozitívan értékelni, ha a stimulációs index legalább ≥ 3. Amikor azonban azt kell meghatározni, hogy egy határértéken lévő eredmény pozitívnak tekintendő-e, akkor a dózis-válasz összefüggés erőssége, a statisztikai szignifikancia és az oldószerrel/vivőanyaggal, valamint a pozitív kontrollal kapott válaszreakciók következetessége is felhasználható (4)(5)(6).

34. Ha a kapott eredmények tisztázást igényelnek, figyelembe kell venni a vizsgált anyag különféle tulajdonságait, és ezen belül azt is, hogy mutat-e szerkezeti rokonságot ismert bőrszenzibilizáló anyagokkal, okoz-e erőteljes helyi bőrirritációt egereknél, illetve hogy milyen a megfigyelt dózis-válasz összefüggés. Ezek, illetve további megfontolások részletesebb tárgyalását lásd a (7) hivatkozásban.

35. A radioaktivitási adatok egyes egerekre vonatkozó gyűjtése lehetővé teszi a dózis-válasz összefüggés adatokban tükröződő fennállásának és mértékének statisztikai elemzését. Bármely statisztikai elemzés tartalmazhatja a dózis-válasz összefüggés értékelését, valamint a vizsgálati csoportok megfelelően korrigált összehasonlításait (például a dóziscsoportok páronkénti összehasonlítása a párhuzamos, vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportokkal). A statisztikai elemzésekben a dózis-válasz tendenciák értékelésénél szerepelhet például lineáris regresszió vagy Williams-féle próba, a páronkénti összehasonlításoknál pedig Dunnett-féle próba. A megfelelő statisztikai elemzési módszer kiválasztásakor a vizsgálónak figyelemmel kell lennie a lehetséges varianciaegyenlőtlenségekre és más kapcsolódó problémákra, amelyek miatt az adatok transzformációjára vagy nem paraméteres statisztikai elemzésre lehet szükség. A vizsgálónak minden esetben el kell végeznie az SI-k kiszámítását és statisztikai elemzéseket bizonyos adatpontokkal (az úgynevezett „kiugró adatokkal”) és azok nélkül.

▼M3

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

36. Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni. Az egyedi állatokon alapuló megközelítés alkalmazása esetén, ki kell mutatni az egyedi DPM-értéket, a csoport átlagos DPM/állat értékeit, az ehhez tartozó hiba értékeket (pl. SD, SEM), valamint az egyes dóziscsoportokra vonatkozó átlagos SI értéket összevetve a megfelelő, vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport értékével. A kezelési csoportokon alapuló összevont megközelítésének alkalmazása esetén az egyes dóziscsoportoknál ki kell mutatni az átlagos/medián DMP és átlagos stimulációs index értékét összehasonlítva a megfelelő vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport értékével.

Vizsgálati jelentés

37. A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyagok és kontrollanyagok:

— azonosító adatok (pl. adott esetben a CAS-szám és az EU-szám; eredet; tisztaság; ismert szennyezők; tételszám),

— fizikai megjelenés és fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. illékonyság, stabilitás, oldhatóság),

— elegy esetén annak összetétele és az egyes komponensek egymáshoz viszonyított aránya,

Oldószer/vivőanyag:

— azonosító adatok (adott esetben tisztaság; koncentráció; alkalmazott térfogat,

— a vivőanyag kiválasztásának indoklása.

Kísérleti állatok:

— CBA egértörzs származása,

— az állatok mikrobiológiai státusa, amennyiben ismert,

— az állatok száma és életkora,

— az állatok származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.,

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgált anyagból előállított készítménnyel és annak alkalmazásával kapcsolatos adatok,

— a dózisszintek megválasztásának indoklása (ezen belül adott esetben az előszűrési vizsgálatok eredményei),

— a vivőanyag és a vizsgált anyag alkalmazott koncentrációja, valamint a vizsgált anyagból alkalmazott teljes mennyiség,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány típusa/eredete, a víz eredete),

— a kezelés adatai és a mintavételek ütemezése,

— a toxicitás mérésére alkalmazott módszerek,

— a pozitív és negatív vizsgálati eredmény kimondásának kritériumai,

— a protokolltól való esetleges eltérések adatai, és annak kifejtése, hogy az eltérés hogyan érintheti vizsgálati tervet és az eredményeket,

A megbízhatóság ellenőrzése:

— a legutóbbi megbízhatósági ellenőrzés eredményeinek összefoglalása az alkalmazott anyag, koncentráció és vivőanyag adataival együtt,

— a vizsgálólaboratórium párhuzamosan és/vagy korábban vizsgált pozitív és párhuzamosan vizsgált negatív kontrollokra vonatkozó adatai,

▼M3

— ha nem vizsgáltak párhuzamosan pozitív kontrollt, a laboratóriumban legutóbb végzett időszakos pozitív kontroll dátuma és laboratóriumi jelentése, valamint pozitív kontroll vizsgálatának korábbi adatait részletező jelentés, amely indokolja, hogy miért nem végzik a laboratóriumban pozitív kontroll párhuzamos vizsgálatát,

Eredmények:

— az egyes állatok testtömege a kezelés kezdetén és az exterminálás tervezett időpontjában, illetve az átlagos és vonatkozó hibamutatók (pl. SD, SEM) kezelési csoportonként,

— a toxicitási tünetek, ezen belül az alkalmazás helyén esetleg kialakuló bőrirritáció megjelenésének időpontja és időbeli alakulása minden egyes állatra vonatkozóan,

— az egy egérre vonatkozó (egyedi állatokon alapuló megközelítés) és az átlagos (kezelési csoportokon alapuló összevont megközelítés) DPM-értékek és SI-értékek kezelési csoportonkénti táblázata,

— átlagos és kapcsolódó hibamutatók (pl. SD, SEM) az állatonkénti DPM-értékek esetében, az egyes kezelés csoportokban, és a kiugró értékek elemzése az egyes kezelési csoportokban, amennyiben az egyedi állatokon alapuló megközelítést alkalmazzuk,

— a kiszámított SI és a variabilitás megfelelő mutatója, amely az egyedek közti variabilitást a vizsgált anyaggal kezelt csoportban és a kontrollcsoportokban egyaránt figyelembe veszi, amennyiben az egyedi állatokon alapuló megközelítést alkalmazzuk,

— dózis-válasz összefüggés,

— adott esetben statisztikai elemzések,

Az eredmények tárgyalása:

— rövid kommentár az eredményekhez, a dózis-válasz elemzéshez és adott esetben a statisztikai elemzésekhez, és következtetés levonása arra vonatkozóan, hogy a vizsgált anyagot bőrszenzibilizáló hatásúnak kell-e tekinteni vagy sem.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Elektronikus formátumban: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165-169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol*., 93, 13-31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327-33.

▼**M3**

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258-273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274-286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249-257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

▼**M3**

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: 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. Elektronikus formátumban: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

1. függelék

Teljesítményszabványok a bőrszenzibilizáció vizsgálatára javasolt hasonló vagy módosított LLNA vizsgálati módszerek értékeléséhez

BEVEZETÉS

1. A teljesítményszabványok (PS) célja annak ismertetése, hogy milyen alapon lehet egy vizsgálati módszerről – akár védett (például szerzői joggal védett, védjeggyel ellátott, bejegyzett), akár nem védett módszerről – megállapítani, hogy adott vizsgálati célokra kellő pontossággal és megbízhatósággal rendelkezik-e. Ezek a hitelesített és elfogadott vizsgálati módszereken alapuló teljesítményszabványok a hasonló tudományos elvekre és mérésre épülő, illetve azonos biológiai vagy toxikus hatást előrevetítő módszerek (köznapi elnevezéssel „me-too" vizsgálatok) megbízhatóságának és pontosságának értékelésére alkalmazhatók (14).

2. A módosított módszerek (például tervezett esetleges javítás egy jóváhagyott vizsgálati módszeren) alkalmazása előtt értékelést kell végezni annak meghatározására, hogy a tervezett változtatások milyen hatást gyakorolnak a vizsgálat teljesítményére, és milyen mértékben befolyásolják a hitelesítési folyamat egyéb összetevőiről rendelkezésre álló információkat. A tervezett változtatások számától és jellegétől, valamint a változtatásokra vonatkozóan keletkezett adatoktól és alátámasztó dokumentációtól függően, ezeket vagy az új vizsgálatokra előírtakkal megegyező hitelesítési eljárásnak, vagy – amennyiben ez lehetséges – a megállapított teljesítményszabványban foglalt korlátozott megbízhatósági és relevanciaértékelésnek kell alávetni (14).

3. Az e vizsgálati módszer alapján alkalmazásra javasolt hasonló vagy módosított eljárásokat megbízhatóságuk és pontosságuk meghatározása érdekében az LLNA-pontértékek teljes tartományát képviselő vegyi anyagok felhasználásával kell értékelni. Állatok indokolatlan felhasználásának elkerülése érdekében kifejezetten ajánlott, hogy a modell kifejlesztői, mielőtt a teljesítményszabványban és a vizsgálati módszer e leírásában adott útmutatásnak megfelelően megkezdenék a hitelesítési vizsgálatokat, egyeztessenek az illetékes hatóságokkal.

4. Ezek a teljesítményszabványok az LLNA hasonló vagy módosított változatainak értékelésére szolgáló US-ICCVAM, EC-ECVAM és Japanese-JaCVAM harmonizált teljesítményszabványokon alapulnak (12). A teljesítményszabvány tartalmazza a vizsgálati módszer alapvető összetevőit, az ajánlott referenciaanyagokat, valamint a pontosság és megbízhatóság azon szabványos értékeit, amelyet a javasolt módszernek el kell érnie, vagy meg kell haladnia.

I. **A vizsgálati módszer alapvető összetevői**

5. Annak biztosítására, hogy a hasonló vagy módosított LLNA módszer funkcionális és mechanikai szempontból megegyező legyen az LLNA-val, és ugyanazt a biológiai hatást mérje, a vizsgálati módszer protokolljában a következő összetevőknek kell szerepelniük:

— a vizsgált anyagot helyileg kell felvinni az egér mindkét fülére,

— a limfocitaproliferációt a vizsgált anyag alkalmazásának területéről elvezető nyirokcsomókban kell mérni,

— a limfocitaproliferációt a bőrszenzibilizáció indukciós fázisában kell mérni,

▼M3

— a vizsgált anyagból alkalmazott maximális koncentrációt úgy kell megválasztani, hogy az ne idézzen elő az egérnél szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű helyi bőrirritációt. Pozitív referenciaanyagok esetében a legmagasabb dózisnak el kell érnie legalább az adott referenciaanyag LLNA EC3 értékét (lásd az 1. táblázatot), ami még nem idéz elő az egérnél szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű helyi bőrirritációt,

— minden vizsgálat során alkalmazni kell párhuzamos negatív kontrollt, és adott esetben párhuzamos pozitív kontrollt is,

— dóziscsoportonként legalább négy állatot kell használni,

— az állatok adatai egyénileg vagy összesítve is gyűjthetők.

Amennyiben e feltételek bármelyike nem teljesül, akkor ezek a teljesítményszabványok a hasonló vagy módosított módszer hitelesítésére nem alkalmazhatók.

II. **A referenciaanyagok minimális listája**

6. Az US-ICCVAM, EC-ECVAM és a Japanese-JaCVAM harmonizált teljesítményszabvány (12) az LLNA teljesítményszabványában 18 minimálisan alkalmazandó referenciaanyagot, valamint négy opcionális referenciaanyagot azonosít (ezek például olyan anyagok, amelyek az LLNA-vizsgálatban álpozitív vagy álnegatív eredményt adtak a humán és a tengerimalacokon végzett vizsgálatokkal összehasonlítva [B.6. fejezet vagy az OECD 406. vizsgálati iránymutatása] (13), ezért lehetőséget biztosítanak az LLNA vizsgálatéval egyenértékű vagy jobb teljesítmény igazolására). E vegyi anyagok kiválasztása során a következő kritériumokat vették figyelembe:

— a referenciaanyagok listája megfelelt a bőrszenzibilizáció hatás szempontjából általában vizsgált anyagok típusainak, valamint az LLNA-val mérhető vagy előre jelezhető válaszreakciók tartományának,

— az anyagok jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek,

— mindegyik anyagról rendelkezésre álltak tengerimalacokon végzett vizsgálatokból (B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (13) és (lehetőség szerint) humán vizsgálatokból származó LLNA-adatok, valamint

— az anyagok kereskedelmi forrásból azonnal elérhetők voltak.

Az ajánlott referenciaanyagok felsorolása az 1. táblázatban található. Az ajánlott referenciaanyagok alkalmazásával végzett vizsgálatokat annál a vivőanyagnál kell értékelni, amellyel együtt az 1. táblázatban szerepelnek. Amennyiben a listában szereplő anyag esetleg nem áll rendelkezésre, akkor megfelelő indoklással az említett kiválasztási kritériumoknak megfelelő egyéb anyagok is használhatók.

▼M3

1. táblázat

Az LLNA teljesítményszabványhoz javasolt referenciaanyagok

Sorszám	Vegyi anyagok ([1])	CAS-szám	Halmazál-lapot	Vivő ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Tényleges EC3-tarto-mány	LLNA vs. tengerimalac	LLNA vs. humán
1	5-klór-2-metil-4-izotiazolin-3-on (CMI)/2-metil-4-izotiazolin-3-on (MI) ([5])	26172-55-4/ 2682-20-4	Foly.	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NSZ	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Szil.	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-feniléndiamin	106-50-3	Szil.	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Kobalt-klorid	7646-79-9	Szil.	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Izoeugenol	97-54-1	Foly.	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Szil.	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NSZ	+/+	+/+
7	Citrál	5392-40-5	Foly.	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Foly.	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Foly.	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Fenil-benzoát	93-99-2	Szil.	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Cinnamil-alkohol	104-54-1	Szil.	AOO	21	1	10,5-42	NSZ	+/+	+/+
12	Imidazolidinil-urea	39236-46-9	Szil.	DMF	24	1	12-48	NSZ	+/+	+/+
13	Metil-metakrilát	80-62-6	Foly.	AOO	90	1	45-100	NSZ	+/+	+/+
14	Klórbenzol	108-90-7	Foly.	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Izopropanol	67-63-0	Foly.	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Sorszám	Vegyi anyagok ([1])	CAS-szám	Halmazál-lapot	Vivő ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Tényleges EC3-tarto-mány	LLNA vs. tengerimalac	LLNA vs. humán
16	Tejsav	50-21-5	Foly.	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Metil-szalicilát	119-36-8	Foly.	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Szalicilsav	69-72-7	Szil.	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Opcionális anyagok az LLNA-hoz viszonyított jobb teljesítmény igazolásához										
19	Nátrium-lauril-szulfát	151-21-3	Szil.	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	Etilén-glikol-dimetakrilát	97-90-5	Foly.	MEK	28	1	14-56	NSZ	+/–	+/+
21	Xilol	1330-20-7	Foly.	AOO	95,8	1	47,9-100	NSZ	+/ (**)	+/–
22	Nikkel-klorid	7718-54-9	Szil.	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Rövidítések: AOO = aceton: olívaolaj (4:1, v/v); CAS-szám = Chemical Abstracts Service szám; DMF = *N,N*-dimetilformamid; DMSO = dimetil-szulfoxid; DNCB = 2,4-dinitroklórbenzol; EC3 = 3-as stimulációs index előidézéséhez szükséges becsült koncentráció; GP = tengerimalacon végzett vizsgálat eredménye (*lásd* B. 6. vagy az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (13); HCA = hexil-cinnamaldehid; Foly. = folyadék; LLNA = murin lokális nyirokcsomó-vizsgálat eredménye (*lásd* B.42. vagy az OECD 429. vizsgálati iránymutatása) (2); MEK = metil-etil-keton; NA = nem alkalmazható, mivel a stimulációs index < 3; NSZ = nem került kiszámításra, mert az adatok egyetlen vizsgálatból származnak; Szil. = szilárd; Vivő, = a vizsgálathoz alkalmazott vivőanyag.

(*) Embereknél feltételezhetően nem okoz szenzibilizációt, mivel klinikai epikután (patch) teszt eredmények nem voltak fellelhetők, nem szerepel az epikután vizsgálati készletekben allergénként, továbbá humán szenzibilizációról szóló esettanulmány nem lelhető fel.

(**) Tengerimalacokra vonatkozó adatok nem állnak rendelkezésre.

([1]) A vegyi anyagokat aznap kell elkészíteni, kivéve, ha stabilitási adatok igazolják, hogy a tárolás elfogadható.

([2]) A különböző vivőanyagok LLNA vizsgálat teljesítményére gyakorolt potenciális hatása miatt az egyes referenciaanyagokhoz ajánlott vivőanyagot kell használni (24) (32).

([3]) Átlagérték, ahol több EC3-érték is rendelkezésre állt. Negatív anyagoknál (3-as alatti stimulációs index) a legmagasabb vizsgált koncentráció van megadva.

([4]) Az adatok forrásául szolgáló LLNA-vizsgálatok száma.

([5]) Kereskedelemben kapható Kathon CG néven (CAS-szám: 55965-84-9), ami CMI és MI 3:1 arányú keveréke. Az egyes összetevők relatív koncentrációja a 1,1-1,25 %-os (CMI) és 0,3–0,45 %-os (MI) tartományban mozog. Inaktív összetevők a magnéziumsók (21,5–24 %) és a réz-nitrát (0,15–0,17 %), a fennmaradó rész pedig 74–77 % víz. A Kathon CG könnyen beszerezhető a Sigma-Aldrich and Rohm and Haas (jelenleg Dow Chemical Corporation) cégtől.

▼M3

III. **A megbízhatóságra és pontosságra vonatkozóan meghatározott szabványok**

7. A hasonló vagy módosított LLNA módszerek pontosságának a minimálisan alkalmazandó 18 referenciaanyaggal vizsgálva el kell érnie vagy meg kell haladnia az LLNA teljesítményszabványában meghatározott pontosságot. Az új vagy módosított módszernek „igen/nem” döntés alapján a vizsgált anyag helyes besorolását kell eredményeznie. Az új vagy módosított módszernek ugyanakkor nem feltétlenül kell az összes minimálisan alkalmazandó referenciaanyagot helyesen besorolnia. Ha például a vizsgálat a gyengén szenzibilizáló anyagok egyikét esetleg nem megfelelően sorolná be, akkor a hibás besorolás elméleti alapjait, valamint megfelelő kiegészítő adatokat (például olyan vizsgálati eredményeket, amelyek alapján a hibásan besorolt referenciaanyagéhoz hasonló fizikai, kémiai és szenzibilizáló jellemzőkkel rendelkező egyéb anyagok besorolása helyesen történt) figyelembe lehetne venni az egyenértékű teljesítmény bizonyítása érdekében. Ilyen körülmények között az új vagy módosított LLNA vizsgálati módszer hitelesítési státusának értékelése eseti alapon történne.

Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság

8. A laboratóriumon belül reprodukálhatóság meghatározásához az új vagy módosított LLNA módszert az LLNA-vizsgálatban jól jellemzett szenzibilizáló anyag használatával kell értékelni. Ezért az LLNA teljesítményszabvány a hexil-cinnamaldehid (HCA) ismételt vizsgálataiból származó eredmények variabilitásán alapul. A laboratóriumon belüli megbízhatóság értékeléséhez négy külön alkalommal, a vizsgálatok között legalább egy hetes időszakot hagyva meg kell határozni a HCA-ra vonatkozó becsült koncentrációküszöb (ECt) értékeit. Akkor elfogadható a laboratóriumon belüli reprodukálhatóság, ha a laboratórium a HCA mindegyik vizsgálata során 5 % és 20 % közötti ECt-értékeket kap, amelyek a HCA-ra vonatkozóan az LLNA-vizsgálatban meghatározott átlagos EC3 (10 %) 0,5–2,0-szeresének felelnek meg (lásd az 1. táblázatot).

Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság

9. Az új vagy módosított LLNA módszer laboratóriumok közötti reprodukálhatóságát az LLNA-vizsgálatban jól jellemzett két szenzibilizáló anyag használatával kell értékelni. Ezért az LLNA teljesítményszabványa a HCA és a 2,4-dinitroklórbenzol (DNCB) különböző laboratóriumokban végzett vizsgálataiból származó eredmények variabilitásán alapul. Az ECt-értékeket függetlenül, legalább három külön laboratóriumban végzett azonos vizsgálat alapján kell kiszámítani. Akkor igazolható a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, ha a HCA-ra mindegyik laboratórium 5 % és 20 % közötti, a DNCB-re pedig 0,025 % és 0,1 % közötti ECt-értékeket kap, amelyek az LLNA-vizsgálatban a HCA-ra (10 %), illetve a DNCB-re (0,05 %) vonatkozóan meghatározott átlagos EC3-koncentráció 0,5-2,0-szeresének felelnek meg (lásd az 1. táblázatot).

▼M3

2. függelék

Fogalommeghatározások

Pontosság: A vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezés” megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (14).

Referenciaanyag: A vizsgált anyaggal való összehasonlítás céljából etalonként használt szenzibilizáló vagy nem szenzibilizáló anyag. A referenciaanyaggal szemben a következő elvárások fogalmazhatók meg: i. állandó és megbízható beszerzési forrásból vagy forrásokból kell származnia; ii. a vizsgált anyagok csoportjához hasonló szerkezettel és funkcionalitással kell rendelkeznie; iii. ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; iv. rendelkezésre kell állniuk az anyag ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és v. a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

Becsült koncentrációküszöb (ECt): Valamely vizsgált anyag ahhoz szükséges becsült koncentrációja, hogy az anyag pozitív válaszreakcióra utaló stimulációs indexet adjon.

Becsült koncentráció 3 (EC3): Valamely vizsgált anyag ahhoz szükséges becsült koncentrációja, hogy hármas stimulációs indexet adjon.

Álnegatív: Valamely vizsgálati módszerrel tévesen negatívnak vagy inaktívnak minősített vizsgált anyag, amely valójában pozitív vagy aktív.

Álpozitív: Valamely vizsgálattal tévesen pozitívnak vagy aktívnak minősített vizsgált anyag, amely valójában negatív vagy inaktív.

Veszély: Káros egészségügyi vagy ökológiai hatások előidézésének lehetősége. A káros hatás csak akkor jelenik meg, ha kellő szintű az expozíció.

Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság: Annak mértéke, hogy a különböző minősített laboratóriumok azonos protokoll és azonos vizsgált anyagok alkalmazásával mennyire képesek minőségileg és mennyiségileg azonos eredményeket produkálni. A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság az előhitelesítési és hitelesítési folyamat során kerül meghatározásra, és annak mértékét jelzi, hogy az adott vizsgálat mennyire sikeresen vihető át laboratóriumok között; más néven laboratóriumok közötti megismételhetőség (14).

Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság: Annak meghatározása, hogy az ugyanazon laboratóriumban dolgozó képzett személyek meghatározott protokoll különböző időpontokban történő alkalmazásával mennyire sikeresen tudják reprodukálni az eredményeket. Más néven laboratóriumon belüli megismételhetőség (14).

Me-too vizsgálat: Olyan vizsgálati módszerek köznapi elnevezése, amelyek strukturálisan és funkcionálisan hasonlóak egy hitelesített és elfogadott referenciaként szolgáló vizsgálati módszerhez. Az ilyen vizsgálati módszerek esetében megfelelő lehet az úgynevezett „catch-up” (rövidített) hitelesítési eljárás. A hasonló vizsgálati módszer szinonimája (14).

Kiugró érték: A kiugró érték olyan megfigyelés, amely szembetűnően eltér az egy populációból vett véletlenszerű minta egyéb értékeitől.

Teljesítményszabványok (PS): Hitelesített vizsgálati módszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, funkcionalitás és végrehajtás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a hitelesített vizsgálati módszer elfogadható teljesítményének igazolására alkalmazott vegyi anyagok közül kiválasztott referenciaanyagok minimális listája; valamint iii. a hitelesített vizsgálati módszerrel kapott eredmények alapján az a hasonló szintű pontosság és megbízhatóság, amelyet a javasolt vizsgálati módszernek a referenciaanyagok minimális listájával történő értékeléskor mutatnia kell (14).

Védett vizsgálati módszer: Olyan vizsgálati módszer, amelynek esetében az előállítást és a forgalmazást szabadalmak, szerzői jogok, védjegyek stb. korlátozzák.

▼**M3**

Minőségbiztosítás: Irányítási folyamat, amelynek során a laboratóriumi vizsgálati szabványok és követelmények betartását, a jegyzőkönyvek vezetését, valamint az adattovábbítás pontosságát a vizsgálatot végző személyektől független személyek ellenőrzik.

Referenciaanyagok: A hitelesítési eljárás során történő alkalmazásra kiválasztott olyan vegyi anyagok, amelyek esetében már ismert az *in vitro* vagy *in vivo* referencia-vizsgálatirendszerben vagy vizsgált fajnál adott válaszreakció. Ezeknek a vegyi anyagoknak reprezentatívaknak kell lenniük arra az anyagcsoportra nézve, amely esetében a vizsgálati módszert várhatóan alkalmazni fogják, és képviselniük kell azon vegyi anyagokra jellemző válaszreakciók teljes tartományát – az erőstől kezdve a gyengén át a negatívig –, amelyek esetében az adott referenciaanyag alkalmazható. A hitelesítési eljárás különböző szakaszaiban, illetve a különböző vizsgálati módszerekhez és vizsgálati alkalmazásokhoz a referenciaanyagok különböző csoportjaira lehet szükség (14).

Relevancia: A vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) kell figyelembe venni (14).

Megbízhatóság: Azonos protokoll szerint végzett vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóságának mérésére szolgál. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (14).

Bőrszenzibilizáció: Immunológiai folyamat, amely akkor jelentkezik, ha egy érzékeny egyén lokálisan érintkezik valamely indukáló hatású allergén vegyi anyaggal, amely esetlegesen kontakt szenzibilizáció kialakulásához vezető immunválaszt vált ki a bőrben.

Stimulációs index (SI): Adott vizsgált anyag bőrszenzibilizációt okozó képességének meghatározására kiszámított érték, amely az anyaggal kezelt csoportban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportban tapasztalt proliferáció aránya.

Vizsgált anyag (más néven vizsgált vegyi anyag): Bármely anyag vagy keverék, amelyet ezzel a vizsgálati módszerrel vizsgálnak.

Hitelesített vizsgálati módszer: Olyan vizsgálati módszer, amely esetében az adott célra történő alkalmazás relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága hitelesítési vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a hitelesített vizsgálati módszerek nem feltétlenül nyújtanak megfelelő teljesítményt a pontosság és megbízhatóság tekintetében ahhoz, hogy egy tervezett alkalmazási célra megfelelőnek minősüljenek (14).

▼B

B.43. **NEUROTOXICITÁSI VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKBAN**

1. **MÓDSZER**

Ez a módszer egyenértékű az OECD TG 424 (1997) módszerrel.

Ennek a vizsgálati módszernek az a célja, hogy megkapjuk egy vegyület felnőtt állatokra gyakorolt neurotoxicitási potenciáljának igazolásához vagy további jellemzéséhez szükséges információkat. A vizsgálat végezhető más, az ismételt dózisú toxicitási vizsgálatokhoz alkalmazott ismert vizsgálati módszerekkel együtt vagy önálló vizsgálatként is. Az e módszeren alapuló vizsgálatok megtervezésekor ajánlatos az OECD Neurotoxicitási Vizsgálati Stratégiák és Módszerek Útmutatóját (1) is igénybe venni. Ez különösen akkor fontos, ha fontolóra vesszük a megfigyelések és vizsgálati eljárások módosítását az e módszer rutinalkalmazásához ajánlottakhoz képest. Az útmutató azzal a céllal készült, hogy elősegítse a konkrét feltételek esetén alkalmazandó egyéb vizsgálati eljárások kiválasztását.

Ez a módszer nem terjed ki a fejlődési neurotoxicitás tanulmányozására.

1.1. BEVEZETÉS

A vegyületek toxikus jellemzőinek vizsgálatakor és értékelésekor fontos figyelembe venni a neurotoxikus hatások lehetőségét. Már az ismételt dózisú szisztémás toxicitási vizsgálati módszer is magában foglal olyan megfigyeléseket, amellyel a neurotoxicitás lehetőségét szűrik. Ez a vizsgálati módszer felhasználható olyan vizsgálatok tervezésére, amelyekkel további információk szerezhetők az ismételt dózisú szisztémás toxicitási vizsgálatokban megfigyelt neurotoxikus hatásokkal kapcsolatban, vagy megerősíthetik azokat. Azonban bizonyos vegyületcsoportok potenciális neurotoxicitásának mérlegelése azt sugallhatja, hogy e módszer alkalmasabb lehet ezek vizsgálatára anélkül, hogy ismételt dózisú szisztémás toxicitási vizsgálatok az adott anyag potenciális neurotoxicitását előre jeleznék. Ilyen megfontolások például a következők:

— neurológiai tünetek vagy neuropathológiai léziók észlelése az ismételt dózisú szisztémás toxicitási vizsgálatoktól eltérő toxicitási vizsgálatokban, vagy

— szerkezeti összefüggések vagy más információk, amelyek kapcsolatba hozzák az anyagot ismert neurotoxikus anyagokkal.

Előfordulhatnak továbbá más olyan esetek is, amikor ezt a módszert érdemes alkalmazni. A további részleteket lásd az (1) hivatkozásban.

E módszert úgy dolgozták ki, hogy annak megfelelő kiigazításával egy vegyület egyedi kórszövettani és viselkedési neurotoxicitásának igazolására vonatkozó sajátos elvárásoknak is megfeleljen, és tegye lehetővé a neurotoxikus válaszok jellemzését és számszerűsítését.

▼B

A neurotoxicitást korábban azonosnak tekintették az idegbántalmakkal (neuropátia), beleértve az idegkórtani bántalmakat vagy idegműködési zavarokat, így például rohamokat, bénulást vagy remegést. Bár az idegbántalmak a neurotoxicitás fontos megnyilvánulási formáit jelentik, ma már világos, hogy az idegrendszeri toxicitásnak számos olyan jele van (pl. a mozgáskoordináció csökkenése, érzékelési zavarok, tanulási és memóriazavarok), amelyek neuropátiás vagy más típusú vizsgálatokban esetleg nem jelennek meg.

E neurotoxicitási vizsgálati módszert úgy alakították ki, hogy alkalmas legyen a jelentősebb viselkedésneurológiai és idegkórtani hatások felnőtt rágcsálókban történő kimutatására. Bár a viselkedésbeli hatások még morfológiai változások hiányában is tükrözhetik az élő szervezetekre gyakorolt káros hatásokat, nem minden viselkedésbeli változás specifikus az idegrendszerre. Így tehát minden megfigyelt változást az ezzel összefüggő kórszövettani, hematológiai vagy biokémiai adatokkal, valamint egyéb típusú szisztémás toxicitásra vonatkozó adatokkal összefüggésben kell értékelni. Az e módszerrel végzett és a neurotoxikus válaszok jellemzését, valamint számszerűsítését célzó vizsgálat specifikus kórszövettani és viselkedésvizsgálati eljárásokat is magában foglal, amelyek további elektrofiziológiai és/vagy biokémiai vizsgálatokkal is alátámaszthatók (1) (2) (3) (4).

A neurotoxikus anyagok egy sor célpontra hathatnak az idegrendszeren belül, és hatásmechanizmusuk is igen sokféle lehet. Mivel nem létezik egyetlen olyan vizsgálatsorozat sem, amelynek segítségével az összes anyag esetében meghatározható lenne a neurotoxikus potenciál, szükség lehet más, a megfigyelt vagy várt neurotoxicitás típusára specifikus *in vivo* vagy *in vitro* vizsgálatokra is.

Ez a vizsgálati módszer arra is felhasználható, hogy az OECD Neurotoxicitási Vizsgálati Stratégiák és Módszerek Útmutatójában (1) megfogalmazott iránymutatással összefüggésben olyan vizsgálatokat is lehessen általa tervezni, amelyek célja, hogy általuk tovább lehessen jellemezni vagy növelni a dózis-válasz összefüggés számszerű meghatározásának érzékenységét annak érdekében, hogy jobban meg lehessen becsülni a nem észlelhető káros hatás szintjét, vagy igazolható legyen a vegyület ismert vagy feltételezett veszélyessége. Olyan vizsgálatok is tervezhetők például, amelyek segítségével meghatározható(k) vagy értékelhető(k) a neurotoxicitási mechanizmus(ok), vagy kiegészíthetők a rendelkezésre álló, alap viselkedésneurológiai és neuropathológiai megfigyelési eljárások alkalmazásával kapott adatok. Az ilyen vizsgálatok esetében nem szükséges olyan adatok gyűjtését megismételni, amelyeket az e módszernél ajánlott standard eljárások alkalmazásával kapnának meg, ha az ilyen adatok már rendelkezésre állnak, és azokat nem tartják szükségesnek a vizsgálat eredményeinek értelmezéséhez.

Ez a neurotoxicitási vizsgálat – akár önállóan, akár más vizsgálatokhoz kapcsolódva végzik – olyan információkat szolgáltat, amelyek:

— meghatározhatják, hogy a vizsgálandó vegyület tartós vagy visszafordítható hatásokat gyakorolt-e az idegrendszerre,

— hozzájárulhatnak a kémiai vegyülettel történő expozícióval járó idegrendszeri elváltozások jellemzéséhez, illetve az ezek hátterében álló mechanizmusok megismeréséhez,

▼B

— meghatározhatják a dózis- és idő-válasz összefüggéseket a nem észlelhető káros hatás szint becsléséhez (amelyet a vegyület biztonsági kritériumainak megállapításához lehet felhasználni).

Ennél a vizsgálati módszernél a vizsgálandó anyagot orálisan adagolják. Más (pl. a dermális vagy inhalálásos) beadási módok esetenként megfelelőbbek lehetnek, amelyek használata esetén szükség lehet a javasolt eljárások módosítására is. A beadási mód kiválasztásával kapcsolatos megfontolások a humán expozíciós profiltól és a rendelkezésre álló toxikológiai és kinetikai adatoktól függenek.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Káros hatás: a normálhoz viszonyított bármilyen, a kezelés okozta elváltozás, amely csökkenti az élő szervezet túlélésre, szaporodásra vagy környezethez való alkalmazkodásra való képességét.

Dózis: a vizsgálandó anyag beadott mennyisége. A dózist tömegegységben (g, mg), vagy a vizsgálandó anyag tömegének és a vizsgált állat tömegegységének hányadosában (pl. mg/kg), vagy a táplálékban lévő állandó koncentrációban (ppm) fejezik ki.

Adagolás: általános meghatározás, amely a dózist, valamint az adagolás gyakoriságát és időtartamát foglalja magában.

Neurotoxicitás: az idegrendszer szerkezetét vagy működését érintő káros elváltozás, amelyet egy kémiai, biológiai vagy fizikai ágens jelentette expozíció idéz elő.

Neurotoxikus anyag: bármilyen kémiai, biológiai vagy fizikai ágens, amely neurotoxicitást tud okozni.

NOAEL: a nem észlelhető káros hatás szintjének (no-observed-adverse effect level) rövidítése, amely azt a legmagasabb dóziszszintet jelöli, amelynél nem figyelhetők meg kezeléssel összefüggő káros hatások.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgálandó vegyületet egy dózistartományon belül több dózisban adagolják orálisan laboratóriumi rágcsálók több csoportjának. Általában ismételt dózisokat kell alkalmazni, és az adagolási rend lehet 28 napos, szubkrónikus (90 napos) vagy krónikus (1 éves vagy annál hosszabb). Az ebben a vizsgálati módszerben leírt eljárások akut neurotoxicitási vizsgálatokhoz is felhasználhatók. Az állatokat olyan módon vizsgálják, hogy lehetőség legyen a viselkedési és/vagy neurológiai rendellenességek észlelésére vagy jellemzésére. Minden megfigyelési időszakban egy sor olyan viselkedést vizsgálnak meg, amelyre hatással lehetnek a neurotoxikus anyagok. A vizsgálat végén az összes csoportból és mindkét nemből kiválasztanak néhány állatot, amelyeknél *in situ* perfúziót végeznek, és amelyekből agyi, gerincvelői és perifériás idegi metszeteket készítenek és vizsgálnak meg.

Ha a vizsgálatot a neurotoxikus hatások megállapítását vagy jellemzését célzó önálló vizsgálatként végzik, a csoportokba tartozó, perfúzióra és ezt követő kórszövettani vizsgálatokra (lásd 1. táblázat) fel nem használt állatokat olyan specifikus viselkedésneurológiai, neuropathológiai, neurokémiai vagy elektrofiziológiai eljárásokhoz lehet felhasználni, amelyek kiegészíthetik az e módszer szerint szükséges standard vizsgálatokkal kapott adatokat (1). E kiegészítő eljárások különösen akkor lehetnek hasznosak, ha empirikus megfigyelések vagy várható hatások a vegyület specifikus típusú vagy specifikus célterületre irányuló neurotoxicitását jelzik. Más esetben a fennmaradó állatok egyéb értékelések, így például a rágcsálókban végzett ismételt dózisú toxicitási vizsgálati módszerekben előírtak céljára alkalmazhatók.

▼B

Ha e vizsgálati módszer eljárásait más vizsgálati módszerek eljárásaival kombinálják, kellő számú állatra van szükség ahhoz, hogy mindkét vizsgálat megfigyelési igényei kielégíthetők legyenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ISMERTETÉSE

1.4.1. **Az állatfaj kiválasztása**

A preferált rágcsálófaj a patkány, bár megfelelő indoklás esetén más rágcsálófajok is alkalmazhatók. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal felnőtt állatokat kell alkalmazni. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. Az adagolást általában az elválasztás után a lehető leghamarabb meg kell kezdeni, lehetőleg még az állatok hathetes koráig, de mindenképpen azelőtt, hogy elérnék a kilenchetes kort. Azonban ha a vizsgálatot más vizsgálatokkal kombinálják, a korra vonatkozó követelményeket esetleg ennek megfelelően módosítani kell. A vizsgálat kezdetén az alkalmazott állatok közötti testtömegeltérés nem haladhatja meg az egyes ivarok átlagának ± 20 %-át. Ha egy hosszú távú vizsgálat előtt előzetes vizsgálatként rövid időtartamú ismételt dózisú vizsgálatot végeznek, mindkét vizsgálatban azonos törzsből és forrásból származó állatokat kell használni.

1.4.2. **Az állatok tartásának és etetésének körülményei**

A kísérleti helyiség hőmérsékletének 22 °C (± 3 °C)-nak kell lennie. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot, a javasolt átlagértéknek 50 és 60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Minimálisra kell csökkenteni az időszakosan jelentkező erős zajokat. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását az is befolyásolhatja, hogy ha a vizsgálandó anyagot táplálékkal adják be, akkor az megfelelően keveredjen el az élelemmel. Az állatokat tarthatjuk egyedileg vagy azonos ivarú egyedekből álló kisebb csoportokban is.

1.4.3. **Az állatok előkészítése**

Az egészséges fiatal állatokat véletlenszerűen kell beosztani a kezelt és kontrollcsoportokba. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezésének lehetséges hatásait. Az állatokat egyedi azonosítóval kell ellátni, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt (5) napig a ketrecükben kell őket tartani, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez.

1.4.4. **A beadási mód és a dózisok előkészítése**

Ez a vizsgálati módszer konkrétan előírja a vizsgálandó anyag orális alkalmazását, amely történhet szondán keresztül, táplálék vagy ivóvíz útján vagy kapszulák beadásával. Más beadási módok (pl. dermális vagy inhalálásos) is használhatók, de emiatt esetleg módosítani kell az ajánlott eljárásokat. A beadási mód megválasztása függ a humán expozíciós profiltól és a rendelkezésre álló toxikológiai vagy kinetikai információktól. A beadási mód megválasztását meg kell indokolni, továbbá meg kell jelölni az ebben a vizsgálati módszerben előírt eljárások emiatt szükségessé vált módosításait is.

▼B

Ha szükséges, a vizsgálandó anyagot megfelelő vivőanyagban fel lehet oldani vagy szuszpendálni. Elsősorban vizes oldatot/szuszpenziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (pl. kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy szuszpenziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot vagy szuszpenziót. Ismerni kell a vivőanyag toxikus jellemzőit. Emellett a vivőanyag következő jellemzőit kell figyelembe venni: a vizsgálandó anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára és visszatartására gyakorolt hatások; a vizsgálandó anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt hatások, amelyek módosíthatják annak toxikus jellemzőit; valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások.

1.5. ELJÁRÁSOK

1.5.1. **Az állatok száma és ivara**

Ha a vizsgálatot önálló vizsgálatként végzik, legalább 20 állatot (10 nőstényt és 10 hímet) kell alkalmazni minden egyes dózis- és kontrollcsoportban a részletes klinikai és funkcionális megfigyelések értékeléséhez. A 10 hím és 10 nőstény közül a vizsgálat végén legalább öt hímet és öt nőstényt kell kiválasztani az *in situ* perfúzióhoz és a részletes ideg-kórszövettani vizsgálatokhoz. Ha az adott dóziscsoportban csak korlátozott számú állatnál lehet megfigyelni neurotoxikus hatásokat, fontolóra kell venni ezeknek az állatoknak is a perfúzióra kijelöltek közé való felvételét. Ha a vizsgálatot egy ismételt dózisú toxicitási vizsgálattal egybekötve végzik, kellő számú állatot kell felhasználni ahhoz, hogy mindkét vizsgálat célkitűzéseit meg tudják valósítani. A vizsgálatok különböző kombinációi esetén szükséges minimális csoportméreteket az 1. táblázat tartalmazza. Ha időközi exterminációkat vagy a toxikus hatások visszafordíthatóságának, tartósságának vagy kezelés utáni késleltetett megjelenésének megfigyelésére gyógyulási csoportokat vagy kiegészítő megfigyeléseket is terveznek, a kísérleti állatok számát úgy kell növelni, hogy elegendő számú állatot biztosíthassanak a megfigyelésekhez és kórszövettani vizsgálatokhoz.

1.5.2. **A kezelt és kontrollcsoportok**

Általában legalább három dóziscsoportot és egy kontrollcsoportot kell alkalmazni, de ha más adatok áttekintése alapján 1 000 mg/testtömeg-kg/nap ismételt dózis alkalmazásakor sem várhatók hatások, akkor lehet határérték-vizsgálatot is végezni. Ha nincs megfelelő adat erre nézve, akkor tartománybehatároló vizsgálat is végezhető az alkalmazandó dózisok meghatározásának elősegítésére. Attól eltekintve, hogy a vizsgálandó anyagot nem alkalmazzák, a kontrollcsoportokban lévő állatokat ugyanúgy kell kezelni, mint a kezelt csoportokban lévőket. Ha a vizsgálandó anyag beadásához vivőanyagot alkalmaznak, a kontrollcsoportnak a legnagyobb alkalmazott térfogatban kell beadni a vivőanyagot.

1.5.3. **A megbízhatóság ellenőrzése**

A vizsgálatot végző laboratóriumnak adatokkal kell igazolnia, hogy el tudja végezni a vizsgálatot, illetve hogy az alkalmazott eljárások megfelelő érzékenységűek. Az ilyen adatoknak bizonyítékkal kell szolgálniuk a megfigyelésre javasolt különféle végpontok, így például az autonóm tünetek, a szenzoros reaktivitás, a végtagok fogóereje, valamint a motoros aktivitás változásainak detektálására és adott esetben számszerűsítésére való képességet. A különböző típusú neurotoxicitási válaszokat kiváltó és pozitív kontrollként alkalmazható vegyületekkel kapcsolatos információk a (2) és a (9) hivatkozásban találhatók. Ha a kísérleti eljárások lényeges vonásai nem változnak, akkor korábbi adatok is felhasználhatók. Javasolt a korábbi adatok időszakos felfrissítése. Az eljárások érzékenységének fennmaradását igazoló új adatokra akkor van szükség, ha a vizsgálat vagy az eljárások valamely lényegi elemét a vizsgálatot végző laboratórium megváltoztatta.

▼B

1.5.4. **A dózisok kiválasztása**

A dózisszinteket a vizsgálandó vegyülettel vagy rokon anyagokkal kapcsolatban esetlegesen rendelkezésre álló korábbi toxicitási és kinetikai adatok figyelembevételével kell meghatározni. A legnagyobb dózist azt a célt szem előtt tartva kell megválasztani, hogy a neurotoxikus hatásokat vagy egyértelmű szisztémás toxikus hatásokat váltson ki. Ezt követően úgy kell csökkenő sorrendben kiválasztani a kisebb dózisokat, hogy meg lehessen határozni a dózissal összefüggő válaszokat, illetve a legkisebb dózisnál a nem észlelhető káros hatás szintjét (NOAEL). A dózisszinteket elvben úgy kell beállítani, hogy meg lehessen különböztetni az idegrendszerre gyakorolt elsődleges toxikus hatásokat a szisztémás toxicitással összefüggő hatásoktól. Gyakran optimális a két-három intervallum alkalmazása, és nagyon nagy intervallumok (pl. 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazása esetén gyakran előnyös a dózisok közé egy negyedik vizsgálati csoportot is beiktatni. Ha létezik a humán expozícióra vonatkozóan elfogadható becslés, akkor ezt is figyelembe kell venni.

1.5.5. **Határérték-vizsgálat**

Ha egy egyetlen, legalább 1 000 mg/testtömeg-kg/nap dózis alkalmazásával történő, az itt ismertetett eljárások szerint elvégzett vizsgálat nem idéz elő észlelhető neurotoxicitást, és ha a szerkezetileg és/vagy metabolizmus szempontjából rokon vegyületekkel kapcsolatos adatok alapján nem várható toxicitás, a három dózisszint alkalmazásával történő teljes vizsgálatot esetenként szükségtelen elvégezni. A várható humán expozíció nagyobb orális dózis alkalmazását teszi esetenként szükségessé a határérték-vizsgálatban. Más típusú beadási módok, így például inhalálás vagy dermális alkalmazás esetén a vizsgálandó anyag fizikaikémiai tulajdonságai gyakran előre jelezhetik a lehetséges expozíciós szint maximumát. Akut orális vizsgálat elvégzéséhez a határérték-vizsgálat során alkalmazott dózisnak legalább 2 000 mg/kg-nak kell lennie.

1.5.6. **A dózisok beadása**

A vizsgálandó anyag dózisait legalább 28 napon át naponta, azaz heti hét napon át kell adagolni az állatoknak; ötnapos adagolási rend vagy rövidebb expozíciós időszak alkalmazását megfelelően indokolni kell. Ha a vizsgálandó anyagot szondán át adagolják, a dózist lehetőleg egyszerre kell egy gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át beadni az állatnak. Az, hogy egyszerre maximálisan mekkora térfogatú folyadék adható be, a kísérleti állatok méretétől függ. A térfogat nem lehet 1 ml/100 g testtömegaránynál nagyobb. Vizes oldatok esetében azonban 2 ml/100 g testtömegarány is alkalmazható. Az irritáló vagy korróziós hatású anyagok kivételével, amelyek esetében a magasabb koncentrációk általában súlyosabb hatásokat okoznak, minimálisra kell csökkenteni a térfogatbeli eltéréseket, amihez a koncentrációt kell úgy beállítani, hogy minden dózisszinten állandó térfogatot lehessen biztosítani.

A táplálékkal vagy ivóvízzel bejuttatott anyagok esetében fontos, hogy a vizsgálandó anyag mennyisége ne zavarja a normál táplálkozást vagy vízháztartást. Ha a vizsgálandó anyagot a táplálékkal juttatják be, vagy a táplálékbeli koncentrációt (ppm), vagy pedig az állat testtömegére számított dózist kell állandó értéken tartani, és meg kell adni, hogy melyik alternatívát alkalmazzák. A szondával bejuttatott anyagok esetében a dózist mindig a nap hasonló időszakában kell beadni, és szükség szerint újra és újra be kell állítani ahhoz, hogy az állat testtömegéhez viszonyítva állandó értéken lehessen tartani. Ha egy hosszú távú vizsgálat előtt előzetes vizsgálatként ismételt dózisú vizsgálatot végeznek, mindkét vizsgálatban hasonló takarmányt kell alkalmazni. Akut vizsgálatok esetén, ha a dózist nem lehet egyszerre bejuttatni, akkor egy legfeljebb 24 órás időtartam alatt részletekben is beadható.

▼B

1.6. MEGFIGYELÉSEK

1.6.1. **A megfigyelések és vizsgálatok gyakorisága**

Ismételt dózisú vizsgálatok esetében a megfigyelési időszaknak az egész kezelési időszakot le kell fednie. Akut vizsgálatok esetében a kezelés után 14 napig kell még megfigyeléseket végezni. A mellékcsoportokba tartozó és a kezelés utáni időszakban expozíció nélkül tartott állatok esetében a megfigyeléseknek ezt az időszakot is le kell fedniük.

A megfigyeléseket kellő gyakorisággal kell végezni, hogy az esetleges viselkedési és/vagy neurológiai rendellenességek észlelésének valószínűsége a lehető legnagyobb legyen. A megfigyeléseket lehetőleg mindig a nap azonos szakában kell végezni, és ehhez figyelembe kell venni azt is, hogy a várt hatások a dózis beadása után mikor érik el a maximumukat. A klinikai megfigyelések és funkcionális vizsgálatok gyakoriságát a 2. táblázatban foglaltuk össze. Ha a kinetikai adatok vagy más, korábbi vizsgálatokban kapott adatok szerint más időpontokat kellene alkalmazni a megfigyelésekhez, vizsgálatokhoz vagy megfigyelések utáni időszakokhoz, alternatív kísérleti programot kell követni a kinyerhető információk maximalizálása érdekében. A kísérleti program ilyen jellegű módosításait meg is kell indokolni.

1.6.1.1. *Az általános egészségi állapot és a megbetegedések/elhullások megfigyelése*

Az állatok egészségi állapotát legalább naponta egyszer, a megbetegedéseket és elhullásokat pedig naponta kétszer gondosan meg kell figyelni.

1.6.1.2. *Részletes klinikai megfigyelések*

Az első expozíciót megelőzően egy alkalommal (az egyeden belüli összehasonlításokhoz), majd ezt követően a vizsgálat teljes időtartamától függően különböző időközönként (lásd 2. táblázat) részletes klinikai megfigyeléseket kell végezni az erre a célra kiválasztott összes állaton (lásd 1. táblázat). A gyógyulási mellékcsoportok részletes klinikai megfigyeléseit a gyógyulási időszak végén kell elvégezni. A részletes klinikai megfigyeléseket a ketrecen kívül, egy standard porondon kell végezni. Az észleléseket egy olyan pontozási rendszer segítségével kell gondosan felvenni, amely a megfigyelés során végzett minden egyes mérés esetében kritériumokat vagy pontozási skálákat is magában foglal. A vizsgálólaboratóriumnak világosan meg kell határoznia az alkalmazott kritériumokat vagy skálákat. Törekedni kell arra, hogy minimálisak legyenek a kísérleti körülmények közötti (a kezeléssel szisztematikusan nem összefüggő) eltérések, és hogy a megfigyeléseket az aktuális kezelést nem ismerő, képzett megfigyelők végezzék.

A megfigyeléseket ajánlatos megtervezetten végezni, amelynek során minden állatra vonatkozóan és minden megfigyelési időpontban világosan meghatározott (a „normál tartomány” meghatározását is magában foglaló) kritériumokat kell szisztematikusan alkalmazni. A „normál tartományt” megfelelően dokumentálni kell. Minden megfigyelt tünetet fel kell jegyezni. Ha megoldható, a megfigyelt tünetek erősségét is fel kell jegyezni. A klinikai megfigyelések többek között a bőr, a szőrzet, a szemek, a nyálkahártyák változásaira, szekrétumok és exkrétumok, valamint az autonóm aktivitás megjelenésére (pl. könnyezés, szőrmeredezés, pupillaméret, szokatlan légzési mintázat és/vagy szájon át történő légzés, szokatlan vizelés vagy székletürítés és elszíneződött vizelet) irányulnak.

▼B

Rögzíteni kell továbbá a testhelyzettel, aktivitási szinttel (pl. a standard porond csökkent vagy fokozott felderítése) és a mozgáskoordinációval kapcsolatos összes szokatlan választ is. A járás (pl. kacsázás, ataxia), a testtartás (pl. púpos tartás) és a megfogás, elhelyezés vagy más környezeti ingerekkel szembeni reaktivitás megváltozását, valamint a rángásos vagy görcsös mozgásokat, görcsös vonaglásokat vagy remegéseket, sztereotípiákat (pl. túlzott tisztálkodást, szokatlan fejmozgásokat, ismétlődő körbejárást) vagy bizarr viselkedést (pl. harapást vagy túlzott nyalogatást, öncsonkítást, hátrafelé menést, hangadást) vagy agressziót is fel kell jegyezni.

1.6.1.3. *Funkcionális vizsgálatok*

A részletes klinikai megfigyelésekhez hasonlóan az expozíció előtt, majd azt követően rendszeres időközönként funkcionális vizsgálatokat is kell végezni az erre kiválasztott összes állaton (lásd 1. táblázat). A funkcionális vizsgálatok gyakorisága is a teljes vizsgálat időtartamától függ (lásd 2. táblázat). A 2. táblázatban megadott megfigyelési időszakok mellett az exterminálóshoz a lehető legközelebbi időpontban a gyógyulási mellékcsoportokban is funkcionális vizsgálatokat kell végezni. A funkcionális vizsgálatok során meg kell figyelni a különféle [pl. hallási, látási és proprioceptív (5) (6) (7)] ingerekre adott szenzoros reaktivitást, és el kell végezni a végtagok fogóerejének (8), valamint a motoros aktivitásnak a vizsgálatát (9). A motoros aktivitást olyan automata berendezéssel kell mérni, amely az aktivitás csökkenés és az aktivitásnövekedés kimutatására is képes. Ha egy másik meghatározott rendszert alkalmaznak, akkor annak kvantitatívnak kell lennie, és igazolni kell annak érzékenységét és megbízhatóságát is. Minden berendezés esetében ellenőrizni kell, hogy időben megbízhatóan, illetve az egyes berendezések egymáshoz képest konzisztensen működnek-e. A követendő eljárásokkal kapcsolatban a további részletek a vonatkozó hivatkozásokban találhatók. Ha nincsenek olyan adatok (pl. szerkezetaktivitási, epidemiológiai adatok vagy más toxikológiai vizsgálati adatok), amelyek potenciális neurotoxikus hatásokat jeleznének, fontolóra kell venni specializáltabb vizsgálatok végzését a szenzoros és motoros működés vagy a tanulás és a memória tanulmányozására, e lehetséges hatások részletesebb vizsgálata érdekében. A specializáltabb vizsgálatokkal és alkalmazásukkal kapcsolatban további információk az (1) hivatkozásban találhatók.

Kivételes esetben ki lehet hagyni a funkcionális vizsgálatból azokat az állatokat, amelyeknél a toxicitás jelei olyan mérvűek, hogy már zavarják az adott vizsgálatot. Meg kell indokolni, amennyiben az ilyen állatokat kizárják valamely funkcionális vizsgálatból.

1.6.2. **Testtömeg és táplálék/vízfogyasztás**

A legfeljebb 90 napig tartó vizsgálatok esetében minden állat testtömegét legalább hetente egyszer meg kell mérni, továbbá legalább hetente a táplálékfogyasztást is ellenőrizni kell (illetve ha a vizsgálandó anyagot az ivóvízzel adják be, akkor annak fogyasztását is). A hosszú távú vizsgálatok esetében az állatok testtömegét az első 13 hét során legalább hetente egyszer, majd azt követően legalább négyhetente meg kell mérni. Az első 13 hét során a táplálékfogyasztást (illetve ha a vizsgálandó anyagot az ivóvízzel adjuk be, akkor annak fogyasztását is) legalább hetente, majd azt követően körülbelül háromhavonta kell megmérni, kivéve ha az egészségi állapot változásai vagy testtömegváltozások azt másképp szabják meg.

▼B

1.6.3. **Szemészeti vizsgálatok**

A 28 napnál hosszabb vizsgálatok esetében lehetőleg minden állaton, de legalább a nagy dózissal kezelt és a kontrollcsoportokba tartozó állatokon a vizsgálandó anyag adagolásának megkezdése előtt, illetve a vizsgálat legvégén szemtükör vagy ezzel egyenértékű és megfelelő eszköz alkalmazásával szemészeti vizsgálatokat kell végezni. Ha szemelváltozást tapasztalnak, vagy ha a klinikai tünetek alapján ez szükségesnek látszik, minden állatot meg kell vizsgálni. A hosszú távú vizsgálatok esetében a 13. héten is szemészeti vizsgálatot kell végezni. Nem kell szemészeti vizsgálatot végezni, ha ilyen adatok más, hasonló időtartamú és hasonló dózisszintek mellett történő vizsgálatokból már rendelkezésre állnak.

1.6.4. **Hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatok**

Ha a neurotoxicitási vizsgálatot ismételt dózisú szisztémás toxicitási vizsgálattal kombinálva végzik, a szisztémás toxicitási vizsgálat vonatkozó módszerében előírtaknak megfelelően hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatokat is végezni kell. A mintavételt úgy kell végrehajtani, hogy minimális legyen a potenciális viselkedésneurológiai hatások kockázata.

1.6.5. **Kórszövettani vizsgálatok**

A neuropathológiai (idegkórtani) vizsgálatot úgy kell megtervezni, hogy egészítse ki és bővítse a vizsgálat *in vivo* fázisában tett megfigyeléseket. Ivaronként és csoportonként legalább 5 állatból (1ásd az 1. táblázatot és a következő bekezdést) szövetmintát kell venni, amelyet azután általánosan elfogadott perfúziós és fixálási technikák alkalmazásával *in situ* fixálni kell (lásd a (3) hivatkozás 5. fejezetét és a (4) hivatkozás 50. fejezetét). Minden makroszkóposan megfigyelhető változást fel kell jegyezni. Amennyiben a vizsgálatot önálló vizsgálatként végzik el a neurotoxicitás szűrése vagy a neurotoxikus hatások jellemzése céljából, a többi állat vagy specifikus viselkedésneurológiai (10) (11), neuropathológiai (10) (11) (12) (13), neurokémiai (10) (11) (14) (15) vagy elektrofiziológiai (10) (11) (16) (17) eljárásokhoz használható fel, amelyek kiegészíthetik az itt ismertetett eljárásokat és vizsgálatokat, vagy növelhetik a kórszövettani vizsgálatok alanyainak számát. E kiegészítő eljárások különösen akkor lehetnek hasznosak, ha empirikus megfigyelések vagy a várható hatások specifikus típusú vagy specifikus célterületre irányuló neurotoxicitást jeleznek (2) (3). Más esetben a fennmaradó állatok az ismételt dózisú toxicitási vizsgálati módszerben leírt rutin patológiai értékelésekhez is felhasználhatók.

A paraffinba ágyazott mintákat megszokott festési eljárással, például hematoxilin-eozin festékkel (H&E) kell megfesteni, és mikroszkópos vizsgálatokat kell végezni. Perifériás neuropátiák megfigyelése vagy gyanúja esetén műanyagba ágyazott perifériás idegszövetmintákat is vizsgálni kell. Egyes klinikai tünetek további helyek vizsgálatát vagy speciális festési eljárások alkalmazását tehetik szükségessé. A további vizsgálati helyekkel kapcsolatban útmutatás a (3) és (4) hivatkozásban található. Hasznos lehet továbbá, ha speciális festéseket alkalmaznak konkrét patológiai változások kimutatásához (18).

▼B

A központi és a perifériás idegrendszerből származó reprezentatív metszeteket szövettani vizsgálatoknak kell alávetni (lásd a (3) hivatkozás 5. fejezetét és a (4) hivatkozás 50. fejezetét). A vizsgált területek általában a következők: az előagy, a nagyagy központi része, ezen belül a hippokampuszt keresztmetszet, a középagy, a kisagy, a híd, a nyúltvelő, a szem a látóideggel és a retinával együtt, a gerincvelő a nyaki és ágyéki duzzanatnál, a dorzális ideggyökér-ganglionok, a dorzális és ventrális ideggyökérrostok, a proximális ülőideg, a proximális sípcsonti ideg (a térdnél) és a sípcsonti ideg lábikraizom-ágai. A gerincvelőből és a perifériás idegekből készített metszeteknek mind keresztirányú vagy haránt-, mind hosszanti metszeteket tartalmazniuk kel. Figyelmet kell szentelni az idegrendszer érhálózatának is. Meg kell vizsgálni egy vázizommintát is, különösen a lábikraizomét. Különös figyelmet kell fordítani a központi és perifériás idegrendszernek azokra a sejtes és rostos struktúrájú és mintázatú területeire, amelyekre különösen hatást gyakorolnak a neurotoxikus anyagok.

A toxikus anyag által tipikusan előidézett neuropathológiai elváltozásokkal kapcsolatban a (3) és a (4) hivatkozásban található útmutatás. Ajánlatos a szövetmintákat lépcsőzetesen megvizsgálni, ami azt jelenti, hogy először a nagy dózissal kezelt csoportokból származó metszeteket hasonlítjuk össze a kontrollcsoportból származókkal. Ha az ezekből a csoportokból származó mintákban nem láthatók neuropathológiai elváltozások, nincs szükség további vizsgálatra. Ha azonban neuropathológiai elváltozásokat észlelnek a nagy dózissal kezelt csoportokban, a köztes és kis dózisú csoportokból származó, potenciálisan érintett szövetekből készített mintákat is kóddal kell ellátni, majd egymás után meg kell vizsgálni őket.

Ha a kvalitatív vizsgálatok során bizonyítékot találnak valamilyen neuropathológiai elváltozásra, akkor az ilyen elváltozást mutató idegrendszeri területeken egy második vizsgálatot is el kell végezni. Az összes dóziscsoportban minden potenciálisan érintett területről metszeteket kell készíteni, amelyeket véletlenszerűen kódokkal kell ellátni, és a kód ismeretének hiányában ugyancsak véletlenszerűen kell őket megvizsgálni. Minden lézió esetében fel kell jegyezni azok gyakoriságát és súlyosságát. Miután minden dóziscsoportban kiértékelték az összes területet, vissza lehet fejteni a kódot, és a dózis-válasz összefüggések megállapítása érdekében statisztikai elemzést lehet végezni. Ismertetni kell az egyes léziók súlyosságának fokozatait.

A neuropathológiai leleteket a viselkedési megfigyelésekkel és mérésekkel, továbbá a korábbi és párhuzamosan végzett szisztémás toxicitási vizsgálatokból származó adatokkal összefüggésben kell értékelni.

2. ADATOK

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Az állatokra vonatkozóan egyedi adatsorokat kell felvenni. Emellett az összes adatot táblázatos formában is össze kell foglalni úgy, hogy minden kezelt és kontrollcsoport esetében mutassa az állatok számát a vizsgálat kezdetén, valamint azoknak a számát, amelyek a vizsgálat során elhullottak vagy humánus módon exterminálásra kerültek, illetve az elhullások és humánus okokból végzett exterminálás időpontját, a toxicitásra utaló tüneteket mutató állatok számát, a megfigyelt toxikus hatások leírását, ezen belül megjelenésük időpontját, valamint ezek időbeli lefolyását, típusát és súlyosságát, és végül a léziókat mutató állatok számát és ezen belül a lézió(k) típusát és súlyosságát.

▼B

2.2. ÉRTÉKELÉS ÉS AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A vizsgálat eredményeit a viselkedésneurológiai és neuropatológiai hatások (ha kiegészítő vizsgálatok is történtek, akkor emellett a neurokémiai vagy elektrofiziológiás hatások) és bármely más megfigyelt káros hatás előfordulása, súlyossága és viszonylagossága alapján kell értékelni. Ahol lehet, a számszerű eredményeket megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazásával kell kiértékelni. A statisztikai módszereket a vizsgálat tervezésekor kell megválasztani.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

— fizikai megjelenés (ezen belül izomerizáció, tisztaság és fizikai-kémiai tulajdonságok),

— azonosító adatok.

Vivőanyag (ha szükséges):

— a vivőanyag megválasztásának indoklása.

Kísérleti állatok:

— az alkalmazott faj/törzs,

— az állatok száma, életkora és ivara,

— származás, tartási körülmények, akklimatizálódás, takarmány stb.,

— az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetén.

Kísérleti körülmények:

— a vizsgálandó anyag formulázásával/a táplálék előkészítésével, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenitásával kapcsolatos adatok,

— a beadott dózisok, ezen belül a vivőanyagra, valamint a beadott anyag térfogatára és fizikai formájára vonatkozó adatok részletes leírása,

— a vizsgálandó anyag adagolására vonatkozó adatok,

— a dózisszintek megválasztásának indoklása,

— az expozíciós út és időtartam megválasztásának indoklása,

— adott esetben a vizsgálandó anyag táplálékban/ivóvízben lévő koncentrációjának (ppm) átszámítása a tényleges dózisra (mg/testtömeg-kg/nap),

— a táplálék és az ivóvíz minőségével kapcsolatos adatok.

Megfigyelések és vizsgálati eljárások:

— az egyes csoportokba tartozó állatoknak a perfúziós alcsoportokba való besorolásával kapcsolatos adatok,

— a pontozási rendszerrel kapcsolatos adatok, beleértve a részletes klinikai megfigyelések során alkalmazott kritériumokat és az egyes méréseknél használt pontozási skálát,

▼B

— a különféle (pl. hallási, látási és proprioceptív) ingerekre adott szenzoros reaktivitáshoz, a végtag-fogó erő értékeléséhez, a motoros aktivitás értékeléséhez (ezen belül az aktivitás detektálására alkalmazott automatikus berendezésekkel kapcsolatos adatok) alkalmazott funkcionális vizsgálatokkal és más alkalmazott eljárásokkal kapcsolatos adatok,

— a szemészeti vizsgálatokkal, valamint adott esetben a hematológiai vizsgálatokkal és klinikai biokémiai vizsgálatokkal kapcsolatos adatok, ideértve a vonatkozó alapértékeket is,

— a különleges viselkedésneurológiai, neuropathológiai és neurokémiai vagy elektrofiziológiai eljárásokra vonatkozó adatok.

Eredmények:

— testtömeg/testtömegváltozások, ezen belül az exterminálásкor mért testtömeg,

— adott esetben a táplálék- és vízfogyasztás,

— toxikus reakciók adatai ivaronként és dózisonként, ezen belül a toxicitás tünetei vagy az elhullás,

— a részletes klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (megjelenése és időbeli lefolyása) (valamint hogy visszafordíthatók-e),

— minden funkcionális vizsgálat eredményének részletes ismertetése,

— boncolási eredmények,

— adott esetben az összes viselkedésneurológiai, neuropathológiai és neurokémiai vagy elektrofiziológiai eredmény részletes ismertetése,

— adott esetben a felszívódással és metabolizmussal kapcsolatos adatok,

— adott esetben az eredmények statisztikai elemzése.

Az eredmények diszkussziója;

— dózis-válasz adatok,

— bármely más toxikus hatás és a vizsgálandó vegyület neurotoxicitási potenciáljával kapcsolatban levont következtetések kapcsolata,

— nem észlelt káros hatás szintje.

Következtetések:

— javasolt a vizsgálandó vegyület teljes neurotoxicitásának konkrét megállapítása.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(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, CL. 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, CL. 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

1. táblázat

A csoportonként szükséges állatok minimális száma, ha a neurotoxicitási vizsgálatot külön, illetve más vizsgálatokkal együtt végzik

	A NEUROTOXICITÁSI VIZSGÁLAT ELVÉGZÉSÉNEK MÓDJA			
	Külön vizsgálat	A 28 napos vizsgálattal együtt végzett vizsgálat	A 90 napos vizsgálattal együtt végzett vizsgálat	A krónikus toxicitási vizsgálattal együtt végzett vizsgálat
Az állatok összlétszáma az egyes csoportokban	10 hím és 10 nőstény	10 hím és 10 nőstény	15 hím és 15 nőstény	25 hím és 25 nőstény
A funkcionális vizsgálatokhoz, ezen belül részletes klinikai megfigyelésekhez kiválasztott állatok száma	10 hím és 10 nőstény	10 hím és 10 nőstény	10 hím és 10 nőstény	10 hím és 10 nőstény
Az *in situ* perfúzióhoz és az ideg-kórszövettani vizsgálatokhoz kiválasztott állatok száma	5 hím és 5 nőstény	5 hím és 5 nőstény	5 hím és 5 nőstény	5 hím és 5 nőstény
Az ismételt dózisú/szubkrónikus/krónikus toxicitási megfigyelésekhez, hematológiai vizsgálatokhoz, klinikai biokémiai vizsgálatokhoz, kórszövettani vizsgálatokhoz stb. (ahogyan az a megfelelő útmutatókban szerepel) kiválasztott állatok száma		5 hím és 5 nőstény	10 hím † és 10 nőstény †	20 hím † és 20 nőstény †
Adott esetben kiegészítő megfigyelések	5 hím és 5 nőstény			

† Magában foglalja a neurotoxicitási vizsgálat keretében végzendő funkcionális vizsgálatokhoz és részletes klinikai megfigyelésekhez kiválasztott öt állatot is.

▼B

2. táblázat

A klinikai megfigyelések és funkcionális vizsgálatok gyakorisága

A megfigyelések típusai		A vizsgálat időtartama			
		Akut	28 napos	90 napos	Krónikus
Minden állatban	Általános egészségi állapot	naponta	naponta	naponta	naponta
	Elhullás/ megbetegedés	naponta kétszer	naponta kétszer	naponta kétszer	naponta kétszer
A funkcionális megfigyelésekhez kiválasztott állatokban	Részletes klinikai megfigyelések	— az első expozíció előtt — az adagolást követően 8 órán belül a hatás csúcsának becsült időpontjában — az adagolás után 7 és 14 nappal	— az első expozíció előtt — ezt követően hetente egyszer	— az első expozíció előtt — egy alkalommal az expozíció első vagy második hetében — ezt követően havonta	— az első expozíció előtt — egy alkalommal az expozíció első hónapjának végén — ezt követően háromhavonta
	Funkcionális vizsgálatok	— az első expozíció előtt — az adagolást követően 8 órán belül a hatás csúcsának becsült időpontjában — az adagolás után 7 és 14 nappal	— az első expozíció előtt — a kezelés negyedik hetében, a lehető legközelebb az expozíció végéhez	— az első expozíció előtt — egy alkalommal az expozíció első vagy második hetében — ezt követően havonta	— az első expozíció előtt — egy alkalommal az expozíció első hónapjának végén — ezt követően háromhavonta

▼B

B.44. BŐRÖN ÁT TÖRTÉNŐ FELSZÍVÓDÁS: *IN VIVO* MÓDSZER

1. MÓDSZER

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 427 (2004) vizsgálattal.

1.1. BEVEZETÉS

Számos vegyszer esetén az expozíció főként a bőrön keresztül történik, miközben a kísérleti állatokon végzett toxikológiai vizsgálatok nagy részét orális úton történő bevitellel végzik. Az ebben az útmutatóban leírt, a bőrön át történő felszívódást tanulmányozó *in vivo* vizsgálat meghatározza azt a kapcsolatot, amely lehetővé teszi, hogy az orális vizsgálatokból extrapoláljuk a bőr expozíciójához kapcsolódó biztonsági szintet.

Az anyagnak nagyszámú sejtrétegen kell áthaladnia, mielőtt eléri a vérkeringést. A legtöbb anyag esetén a felszívódás sebességét a *stratum corneum* határozza meg, amely elhalt sejtekből áll. A bőrön keresztüli áteresztőképesség függ a vegyszer lipofilicitásától és az epidermisz külső rétegének vastagságától, valamint olyan tényezőktől, mint az anyag molekulatömege és koncentrációja. Általában a patkányok és a nyulak bőre nagyobb áteresztőképességgel rendelkezik, mint az emberé, míg a tengerimalac és a majom bőrének áteresztőképessége közelebb áll az emberéhez.

A bőrön át történő felszívódás vizsgálati módszereit két csoportba lehet sorolni: az *in vivo* és az *in vitro* módszerek csoportjába. Az *in vivo* módszer különféle kísérleti fajok esetében megbízható információt nyújt a bőrön át történő felszívódásra vonatkozóan. Az utóbbi időben dolgozták ki az *in vitro* módszereket. Ezek a teljes vagy részleges vastagságú állati vagy emberi bőrön át egy folyadéktartály felé történő anyagszállítás mérésén alapulnak. Az *in vitro* módszert egy külön vizsgálati módszer (1) ismerteti. Adott feltételek esetén a legmegfelelőbb módszer kiválasztásához ajánlatos tanulmányozni az OECD által a bőrön át történő felszívódási vizsgálatok lefolytatásáról kiadott útmutató dokumentumot (2), amely az *in vivo* és az *in vitro* módszerek alkalmasságára vonatkozóan több részletettel szolgál.

Az ebben a módszerben leírt *in vivo* módszer lehetővé teszi, hogy meghatározzuk, hogyan jut be a kísérleti anyag a bőrön át a szervi rekeszbe. Az eljárást évek óta széles körben használják (3) (4) (5) (6) (7). Bár a bőrön át történő felszívódásra vonatkozó *in vitro* vizsgálatok számos esetben megfelelők lehetnek, elképzelhetők olyan helyzetek, amelyekben csak az *in vivo* vizsgálat nyújthatja a szükséges adatokat.

Az *in vivo* módszer előnye, hogy fiziológiailag és az anyagcsere szempontjából sértetlen szervezetet használ, a vizsgálatot a toxikológiai vizsgálatokban rutinszerűen használt fajon végzik, ugyanakkor más fajok esetén módosítható. Hátránya, hogy élő állatokat használ, a megbízhatóbb eredmények érdekében radioaktívan jelzett anyagokra van szükség, nehézkes a korai felszívódási fázis meghatározása, és az előnyben részesített faj (patkány) bőrének áteresztőképessége eltér az emberétől. Az állati bőrnek általában nagyobb az áteresztőképessége, ezért az emberi bőrön át történő felszívódást a vizsgálat túlbecsülheti (6) (8) (9). Égető/maró anyagokat nem szabad élő állatokon kipróbálni.

▼B

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Fel nem szívott dózis: az a dózis, amelyet az expozíció után a bőr felületéről lemosnak, továbbá amely a nem záró fedőrétegen található, beleértve azt a dózist is, amelyről kimutatható, hogy az expozíció alatt a bőrről elpárolgott.

Felszívott dózis (in vivo): az a dózis, amely a vizeletben, a ketrec mosóoldatában, az ürülékben, a kilélegzett levegőben (ha mérik), a vérben, a szövetekben (ha gyűjtik) és a kísérleti preparátummal érintett bőrterület eltávolítása után fennmaradó tetemben jelen van.

Felszívható dózis: az a dózis, amely a lemosás után a bőrön vagy a bőrben található.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A lehetőleg radioaktívan jelzett kísérleti anyagot egy vagy több megfelelő dózisszinten, szokásosan használt preparátum formájában felviszik az állat lenyírt bőrére. A kísérleti preparátum egy meghatározott időtartamig marad kapcsolatban a bőrrel, megfelelő (nem záró, félig záró vagy záró) védőtakaró alatt, amely megakadályozza a kísérleti preparátum lenyelését. Az expozíció időtartamának lejártával a védőtakarót eltávolítják, a bőrt megfelelő tisztítószerrel megtisztítják, a védőtakarót és a tisztítóanyagokat elemzésre félreteszik, és új védőtakarót tesznek fel. Az állatokat az expozíciós időszak előtt, alatt és után egyedi anyagcsereketrecekben tartják, és a salakanyagokat, valamint a kilélegzett levegőt ezen időszak alatt elemzés céljából összegyűjtik. A kilélegzett levegő összegyűjtése elhagyható, ha megfelelő információ áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy nem, vagy csak kis mennyiségben keletkezik illó radioaktív metabolit. A vizsgálatok során általában több állatcsoporton alkalmazzák a kísérleti preparátumot. Az egyik csoportot az expozíciós időszak elteltével elpusztítják. Más csoportokat ezután bizonyos meghatározott időközönként pusztítanak el (2). A mintavételi időszak végén elpusztítják a megmaradó állatokat, a vért elemzés céljából összegyűjtik, az alkalmazás helyét elemzés céljából eltávolítják, és a tetemet megvizsgálják az esetleges nem kiválasztott anyagok szempontjából. A mintákat megfelelő eszközökkel elemzik, és meghatározzák a bőrön át történő felszívódás mértékét (6) (8) (9).

1.4. A MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Az állatfaj kiválasztása**

Leggyakrabban patkányt alkalmaznak, de az emberéhez közelebb álló bőrön át történő felszívódási sebességgel rendelkező, szőr nélküli fajták és fajok is használhatók (3) (6) (7) (8) (9). A kísérleti állatok legyenek egyneműek (alapesetben hímneműek), fiatalok, felnőttek és egészségesek. A vizsgálat elején a használt állatok súlya ± 20 %-nál nagyobb mértékben nem térhet el az átlagos súlytól. Például a hímnemű patkányoknál a 200–250 g testtömeg, de inkább ennek a tartománynak a felső része kívánatos.

▼B

1.4.2. **Az állatok száma és neme**

Minden kísérleti preparátum esetében és minden ütemezett befejezési idő tekintetében egy-egy legalább négy egynemű egyedből álló csoportot kell kialakítani. Minden egyes időintervallum elteltével, például az expozíciós időszak (jellemzően 6 vagy 24 óra) végén és az ezt követő alkalmakkor (pl. 48 és 72 óra) elpusztítanak egy-egy állatcsoportot. Ha van olyan adat, amely a hímek és a nőstények között fennálló alapvető különbségekre utal a dermális toxicitás tekintetében, akkor az érzékenyebb nemet kell kiválasztani. Ha nincs ilyen adat, akkor bármelyik nem alkalmazható.

1.4.3. **Tartási és etetési feltételek**

Az állatkísérleti teremben a hőmérséklet 22 °C (± 3 °C) legyen. Bár a relatív páratartalomnak legalább 30 %-nak kell lennie, és lehetőleg nem haladhatja meg a 70 %-ot, kivéve a terem takarításának idejét, 50–60 %-os érték beállítására kell törekedni. A világítás legyen mesterséges, váltakozva 12 óra világosság és 12 óra sötétség. Az etetésnél a szokásos laboratóriumi étrend alkalmazható; az élelem és az ivóvíz mennyisége legyen korlátlan. A vizsgálat idején, és lehetőleg az akklimatizálódás idején is, az állatokat egyedi anyagcsereketrecekben kell tartani. Mivel a táplálék és a víz kiömlése befolyásolhatja az eredményeket, ennek lehetőségét a minimumra kell szorítani.

1.4.4. **Az állatok előkészítése**

Az állatokat az egyedi azonosíthatóság céljából megjelölik, és a laboratóriumi feltételekhez való akklimatizálódás érdekében öt nappal a vizsgálat megkezdését megelőzően egyedi ketrecükben tartják őket.

Az akklimatizálódás időszakát követően és körülbelül a kezelés megkezdését 24 órával megelőzően minden állatnak a váll- és hátrészén egy bőrterületet megnyírnak. A sérült bőr felszívási jellemzői eltérnek az ép bőrétől, ezért vigyázni kell, nehogy felhorzsolódjon a bőr. A nyírást követően és körülbelül 24 órával azelőtt, hogy a kísérleti anyag a bőrre kerül (lásd az 1.4.7. szakaszt), a faggyú eltávolításához a bőr felületét acetonnal le kell törölni. A szappannal és vízzel történő lemosás nem ajánlott, mivel az esetleges szappanmaradvány fokozhatja a kísérleti anyag felszívódását. A terület megfelelő nagyságú, lehetőleg legalább 10 cm^2 legyen, hogy a kísérleti vegyszer felszívódásának a bőr cm^2-ére jutó mennyiségét megbízhatóan lehessen számítani. Ez a terület a 200–250 g testtömegű patkányok esetén biztosított. Az előkészítés után az állatok visszakerülnek az anyagcsereketrecekbe.

1.4.5. **Kísérleti anyag**

A kísérleti anyag az az anyag, amelynek penetrációs jellemzőit vizsgáljuk. Ideális esetben a kísérleti anyag radioaktívan jelzett.

1.4.6. **Kísérleti preparátum**

A kísérletianyag-preparátumnak (a kísérleti anyagot tartalmazó, tiszta, hígított vagy formulázott anyag, amelyet felvisznek a bőrre) meg kell egyeznie azzal az anyaggal (vagy reális helyettesítőjének kell lennie annak az anyagnak), amelynek az ember vagy más lehetséges célfajok ki lehetnek téve. A „szokásosan használt” preparátumtól való bárminemű eltérésre csak indokolt esetben van lehetőség. Ha szükséges, akkor a vizsgált anyagot fel kell oldani vagy szuszpendálni kell valamilyen alkalmas vivőanyagban. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a felszívódási jellemzőket és a kísérleti anyaggal történő esetleges kölcsönhatást.

▼B

1.4.7. **A bőrre történő felvitel**

A bőr felszínének egy bizonyos felületén kijelölik a felvitel helyét. Ezután erre a helyre egyenletesen elosztva ismert mennyiségű kísérleti preparátumot visznek fel. Ez a mennyiség általában az emberi expozícióhoz hasonló, szokásos esetben szilárd anyag esetében 1–5 mg/cm^2, folyadék esetében pedig akár 10 µl/cm^2 lehet. Az ettől eltérő mennyiséget a várható használati feltételeknek, a vizsgálat célkitűzéseinek vagy a kísérleti preparátum fizikai jellemzőinek kell indokolnia. Az alkalmazást követően a kezelt területet védeni kell a vakarás ellen. Az eszköz jellemző kialakítására mutat példát az 1. ábra. A felvitel helyét általában nem záró védőtakaróval (pl. áteresztő nejlon géztakaróval) védeni kell. Ugyanakkor végtelen dózis esetén a felvitel helyét le kell zárni. Ha a félig illékony kísérleti anyag párolgása következtében a kísérleti anyag visszanyerési aránya elfogadhatatlan mértékig csökken (lásd az 1.4.10. szakasz első bekezdését is), akkor az elpárolgó anyagot célszerű az adagolóeszközt takaró szénszűrőben felfogni (lásd 1. ábra). Fontos, hogy semmilyen eszköz sem sértheti fel a bőrt, nem szívhatja fel a kísérleti anyagot és nem léphet azzal reakcióba. Az állatokat a salakanyagok gyűjtése érdekében vissza kell vinni az egyedi anyagcsereketrecekbe.

1.4.8. **Az expozíció időtartama és a mintavétel**

Az expozíció időtartama az az időintervallum, amely a kísérleti anyag felvitele és a bőr lemosásával történő eltávolítása között telik el. A várható emberi expozíciós időtartamnak megfelelően kellő expozíciós időtartamot (jellemzően 6 vagy 24 órát) kell alkalmazni. Az expozíciós időszak elteltével az állatokat az ütemezett elpusztításig az anyagcsereketrecekben tartják. Az állatokat a vizsgálat teljes ideje alatt, rendszeres időközönként, a toxicitás/rendellenes reakciók jeleinek kimutatása végett meg kell figyelni. Az expozíciós időszak elteltével az irritáció látható jeleinek kimutatása végett a kezelt bőrt szemrevételezni kell.

Az anyagcsereketrecek tegyék lehetővé a vizsgálat teljes időtartama alatt a vizelet és az ürülék külön gyűjtését. Tegyék lehetővé továbbá a ^{14}C-szén-dioxid és az illó ^{14}C-szénvegyületek gyűjtését, amelyeket elemezni kell, ha nagyobb mennyiségben (> 5 %) termelődnek. A vizeletet, az ürüléket és a csapdafolyadékokat (pl. a ^{14}C-szén-dioxidot és az illó ^{14}C-szénvegyületeket) csoportonként és mintavételi időpontonként egyedileg kell gyűjteni. Ha kellő információ áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy nem képződik vagy csak kis mennyiségben képződik illó radioaktív metabolikum, akkor nyitott ketrecek is használhatók.

A salakanyagok gyűjtésére az expozíciós időszakban, a bőrrel történő első érintkezést követően 24 óráig, majd a kísérlet végéig naponta kerül sor. Bár általában három ürülékgyűjtési időszak elegendő, a kísérleti preparátum előirányzott célja vagy a rendelkezésre álló kinetikai adatok függvényében alkalmasabb, vagy további vizsgálati időpontok kijelölésére is szükség lehet.

Az expozíciós időszak végén a védőeszközt minden állatról leveszik, és elemzésre külön félreteszik. Az állatok kezelt bőrét megfelelő törlőkendő használatával legalább háromszor tisztítószerrel le kell mosni. Vigyázni kell, hogy a test más része ne szennyeződjön be. A tisztítószer feleljen meg a szokásos higiéniai gyakorlatnak, például lehet vizes szappanoldat. Végül a bőrt meg kell szárítani. A törlőkendőket és a lemosott oldatot elemzésre félre kell tenni. A későbbre ütemezett csoportba tartozó állatokon, mielőtt egyedi ketreceikbe visszatérnek, a kezelt terület védelmére friss védőtakarót kell alkalmazni.

▼B

1.4.9. **Befejező eljárások**

Minden csoport esetében az egyes állatokat az ütemezés szerint kell elpusztítani, és a vért elemzés céljából össze kell gyűjteni. A védőeszközt vagy a védőtakarót az elemzés céljából el kell távolítani. A kezelt bőrfelületet és egy ahhoz hasonló, nem kezelt lenyírt bőrfelületet minden állatról külön elemzés céljából el kell távolítani. Az alkalmazás területe a *stratum corneumnak* az alatta lévő epidermisztől történő leválasztásával feloszthető annak érdekében, hogy a kísérleti vegyszer eloszlására vonatkozóan több információt lehessen összegyűjteni. Ennek az eloszlásnak az expozíciós időszak után egy bizonyos idő elteltével történő meghatározása utalhat arra, hogy milyen sorsra jutott a *stratum corneumban* maradó esetleges kísérleti vegyszer. A bőr felosztásának megkönnyítése érdekében (a végső bőrlemosást és az állat elpusztítását követően) el kell távolítani a védőtakarót. A kezelt bőrfelületet a körülötte lévő bőrgyűrűvel együtt lenyúzzák a patkányról és egy táblára szegezik. Egy ragasztószalagcsíkot gyengéden a bőrfelületetre nyomnak, majd a *stratum corneum* egy részével együtt eltávolítják. További ragasztószalagcsíkokat alkalmaznak mindaddig, amíg a szalag már nem ragad a bőrfelülethez, azaz már a teljes *stratum corneumot* eltávolították. Minden egyes állat valamennyi ragasztószalagcsíkja egyetlen konténerbe gyűjthető össze, amelybe szövetoldószert adagolnak a *stratum corneum* feloldására. Mielőtt a tetemet a felszívott dózis szempontjából elemzésnek vetnék alá, az esetleges külön vizsgálat céljára szolgáló célszövetek eltávolíthatók. Az egyes állatok tetemét elemzésre félre kell tenni. Rendszerint elegendő elemezni a teljes tartalmat. Külön vizsgálat céljából a megfelelő célszervek eltávolíthatók (ha ezt más vizsgálatok igénylik). Az ütemezett elpusztításkor a húgyhólyagban lévő vizeletet hozzá kell adni a korábban összegyűjtött vizelethez. Az ütemezett elpusztításkor az ürülék kigyűjtése után az anyagcsereketreceket és a csapdáikat megfelelő oldószerrel el kell mosni. Az egyéb, esetleg szennyezett eszközöket ugyancsak meg kell vizsgálni.

1.4.10. **Elemzés**

Valamennyi vizsgálat során megfelelő visszanyerést kell elérni (azaz a radioaktivitás átlagosan 100 ± 10 %-át). Az ezen a tartományon kívüli visszanyerést indokolni kell. Az alkalmazott dózis mennyiségét minden mintában megfelelően hitelesített eljárással kell megvizsgálni.

Statisztikai szempontból célszerű lehet megállapítani az egyes dózisokhoz tartozó eredmények szórását.

2. **ADATOK**

A kísérleti vegyszer és a metabolikum tekintetében egyedenként és mintavételi időpontonként a következő méréseket kell elvégezni. Az egyedi adatokon kívül a mintavételi időpontokhoz tartozó adatok átlagát is meg kell adni.

— A védőeszközökhöz rendelt mennyiség,

— a bőrről eltávolítható mennyiség,

— a bőrben/bőrön található le nem mosható mennyiség,

▼B

— a vizsgált vérben lévő mennyiség,

— az ürülékben és (ha szükséges) a kilélegzett levegőben lévő mennyiség,

— a tetemben és a külön vizsgálatok céljából kiemelt szervekben maradó mennyiség.

Az ürülékben, a kilélegzett levegőben, a vérben és a tetemben lévő kísérleti anyag és/vagy metabolikum mennyisége lehetővé teszi a teljes felszívott mennyiség minden egyes időpontban történő meghatározását. Ugyancsak meghatározható az expozíciós időszakban a kísérleti anyagnak a bőr cm^2-ére jutó felszívott mennyisége.

3. **JEGYZŐKÖNYV**

3.1. A KÍSÉRLETI JEGYZŐKÖNYV

A kísérleti jegyzőkönyv tartalmazza a kísérlet leírásában meghatározott követelményeket, beleértve a használt vizsgálati rendszer indoklását, valamint a következőket:

Kísérleti anyag:

— azonosítási adatok (pl. CAS-szám, ha rendelkezésre áll; származás; tisztaság [radiokémiai tisztaság]; ismert szennyeződések; tételszám),

— fizikai természet, fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. pH, illékonyság, oldhatóság, stabilitás, molekulatömeg és log P_{ow}).

Kísérleti preparátum:

— formuláció és megválasztásának indoklása,

— a preparátum részletes adatai, a felvitt mennyiség, az elért koncentráció, vivőanyag, stabilitás és homogenitás.

Kísérleti állatok:

— használt faj/fajta,

— az egyedek száma, kora és neme,

— az egyedek származása, tartási körülményei, étrendje stb.,

— az egyedek súlya a kísérlet megkezdésekor.

Kísérleti körülmények:

— a kísérleti preparátum adagolásának részletei (a felvitel helye, a mennyiségi elemzés módszerei, elzárás/nem elzárás, térfogat, kinyerés, kimutathatóság),

— a táplálék és az itatóvíz minőségére vonatkozó adatok.

Eredmények:

— a toxicitás bármilyen jele,

— táblázatba foglalt felszívódási adatok (arányszámban, abszolút mennyiségben vagy százalékban kifejezve),

▼B

— a teljes visszanyerés a kísérlet során,

— az eredmények értelmezése, hasonló, a kísérleti vegyület bőrön át történő felszívódására vonatkozó korábbi kísérletek hozzáférhető adataival való összehasonlítás.

Az eredmények szöveges értékelése.

Következtetések.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(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.

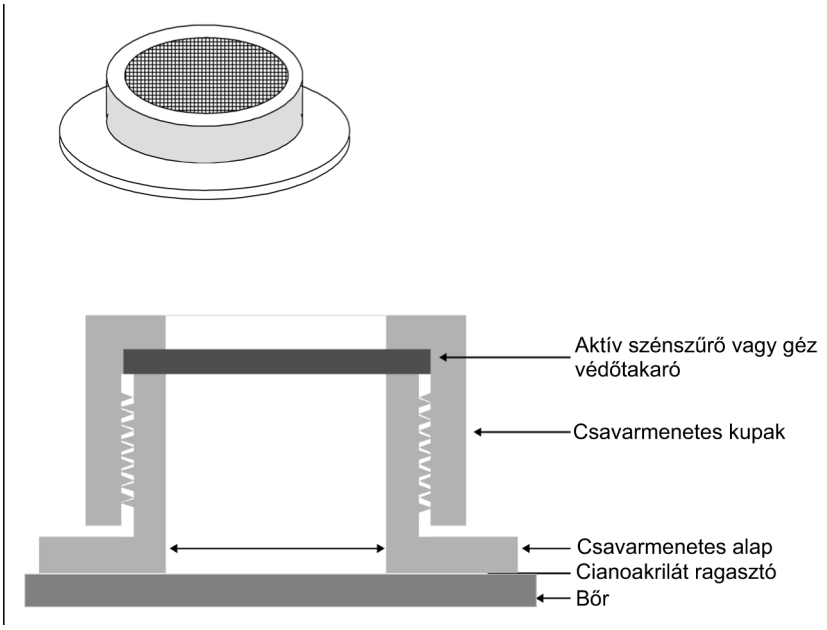
(8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990). *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369–373.

(9) Feldman RJ and Maibach HI (1970). Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399–404.

▼B

1. ábra

Példa a bőrön át történő felszívódásra vonatkozó *in vivo* kísérletek során a bőrre történő felvitel helyének meghatározására és védelmére szolgáló jellemző eszközre



▼B

B.45. BŐRÖN ÁT TÖRTÉNŐ FELSZÍVÓDÁS: *IN VITRO* MÓDSZER

1. MÓDSZER

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 428 (2004) vizsgálattal.

1.1. BEVEZETÉS

A módszer célja, hogy adatokat szolgáltasson a kísérleti anyag bőrből kimetszett mintán keresztül történő felszívódására vonatkozóan. A módszer összekapcsolható a bőrön át történő felszívódás *in vivo* módszerével (1), de különállóan is lefolytatható. A módszeren alapuló vizsgálatok tervezéséhez ajánlatos az OECD által a bőrön át történő felszívódási vizsgálatok lefolytatásáról kiadott útmutató dokumentum (2) tanulmányozása. Az útmutató dokumentum azért készült, hogy konkrét körülmények között történő használat esetén megkönnyítse a megfelelő *in vitro* eljárások kiválasztását annak érdekében, hogy az ezen módszerrel nyert eredmények kellő megbízhatóságúak legyenek.

A bőrön át történő felszívódásra és a bőr szállítóképességére vonatkozó mérési módszereket két csoportba lehet sorolni: az *in vivo* és az *in vitro* módszerek csoportjába. A bőrön át történő felszívódás *in vivo* módszere gyakran alkalmazott eljárás, és számos állatfajra vonatkozóan nyújt farmakokinetikai információkat. Egy *in vivo* módszert ismertet egy másik vizsgálati módszer (1). Az *in vitro* módszereket is évek óta használják a bőrön át történő felszívódás mérésére. Bár az itt leírt *in vitro* módszer formális validálását még nem végezték el, az OECD szakértői 1999-ben megállapították, hogy elegendő kiértékelt adat áll rendelkezésre az *in vitro* módszer alátámasztására (3). Az útmutató dokumentum (2) további, e döntést igazoló részleteket tartalmaz, többek között nagyszámú példát az *in vitro* és az *in vivo* módszerek közvetlen összehasonlítására. A témát számos monográfia tekinti át, amelyek részletes háttéranyagot nyújtanak az *in vitro* módszerek használatára vonatkozóan (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). Az *in vitro* módszerek a vegyszereknek a bőrbe és a bőrön át, egy folyadéktartály felé történő diffúzióját vizsgálják, és használhatnak élettelen bőrt is kizárólag a diffúzió vizsgálatához, vagy friss, az anyagcsere szempontjából aktív bőrt annak érdekében, hogy egyszerre vizsgálják a diffúziót és a bőr anyagcseréjét. Az ilyen módszereket különösen annak összehasonlítására használják, hogy hogyan zajlik le a különféle vegyszerkészítményeknek a bőrbe és a bőrön át történő bejutása, valamint hasznos modellként szolgálhatnak az emberi bőrön át történő felszívódás értékelésére is.

Az *in vitro* módszer nem minden helyzetben és nem minden vegyszerfajtával alkalmazható. Egyes esetekben az *in vitro* módszerek kiindulásképpen, a bőrbe való behatolás kvalitatív értékelésére használhatók. Bizonyos esetekben szükség lehet arra, hogy az így nyert eredményeket *in vivo* adatokkal egészítsük ki. Az útmutató dokumentum (2) részletesebben is ismerteti azokat a körülményeket, amikor érdemes az *in vitro* módszerekhez folyamodni. A döntés alátámasztására szolgáló további részletes információk a (3) hivatkozásban találhatók.

Ez a módszer egy kísérleti anyagnak a bőrön át történő felszívódására és továbbítására vonatkozó vizsgálatának általános elveit mutatja be bőrből kimetszett minta esetében. Számos emlősfaj bőre használható, beleértve az emberét is. A bőr áteresztőképességi jellemzői a testből való kimetszés után is változatlanok maradnak, mivel a diffúzió fő gátja az élettelen *stratum corneum;* vegyszereknek bőrön át történő aktív továbbítását nem állapították meg. Kimutatták, hogy a bőrön át történő felszívódás során a bőr képes metabolizálni bizonyos vegyszereket (6), de ez a folyamat nem korlátozza az adott dózis felszívódási sebességét, bár hatással lehet a véráramba bekerülő anyag természetére.

▼B

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Fel nem szívott dózis: az a dózis, amelyet az expozíció után a bőr felületéről lemosnak, továbbá amely a nem záró fedőrétegen található, beleértve azt a dózist is, amelyről kimutatható, hogy az expozíció alatt a bőrről elpárolgott.

Felszívott dózis *(in vitro):* a kísérleti anyagnak az a tömege, amely egy meghatározott időtartam alatt elérte a receptorfolyadékot vagy a szisztémás keringést.

Felszívható dózis *(in vitro):* *az a* dózis, amely a lemosás után a bőrön vagy a bőrben található.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A kísérleti anyagot, amely radioaktívan jelzett is lehet, felviszik egy, a diffúziós cella két kamráját elválasztó bőrminta felületére. A vegyszer meghatározott ideig, meghatározott feltételek között a bőrön marad, majd megfelelő tisztító eljárással eltávolítják. A receptorfolyadékból a kísérlet során bizonyos időközönként mintát vesznek, és elemzik a kísérleti vegyszer és/vagy a metabolikum tekintetében.

Anyagcsere szempontjából aktív szervezet használata esetén megfelelő módszerrel elemezni lehet a kísérleti vegyszer metabolikáját. A kísérlet végén, ha szükséges, megmérik a kísérleti vegyszer eloszlását és metabolikumát.

Az ebben a módszerben és az útmutató dokumentumban (2) leírt megfelelő feltételek megléte esetén az egy bizonyos időtartam alatt felszívódott kísérleti anyag mennyiségét a receptorfolyadék és a kezelt bőr elemzésével vizsgálják. A bőrben maradó kísérleti anyagot felszívottnak kell tekinteni, kivéve akkor, ha kimutatható, hogy a felszívódás kizárólag a receptorfolyadék alapján is meghatározható. A többi összetevő elemzése (a bőrről lemosott és a bőr rétegeiben megmaradt anyagok) lehetővé teszi a további adatértékelést, beleértve a kísérleti anyag teljes eloszlása és a visszanyerési arány elemzését is.

A kísérletet végző laboratórium vizsgálati rendszere alkalmasságának és megbízhatóságának kimutatása érdekében rendelkezésre kell állniuk a vonatkozó referencia-vegyszerekre vonatkozó eredményeknek, amelyeknek összhangban kell lenniük a használt módszerre vonatkozó publikált szakirodalommal. Ez a követelmény egy alkalmas (lehetőleg a kísérleti anyaghoz közeli lipofilicitású) referencia-vegyszerrel és párhuzamosan a kísérleti anyaggal végzett kísérlettel, vagy pedig megfelelő korábbi, több, különféle lipofilicitású referenciaanyagra (pl. koffein, benzoesav és tesztoszteron) vonatkozó adattal teljesíthető.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Diffúziós cella**

A diffúziós cella donorkamrából és receptorkamrából áll, amelyek közé elhelyezik a bőrt (egy tipikus elrendezés található az 1. ábrán). A cellának jól kell záródnia a bőr körül, biztosítania kell a bőr alsó felületével érintkező receptorfolyadék jó keveredését és a receptorfolyadékból való könnyű mintavételt, és alkalmasnak kell lennie a cella és tartalma hőmérsékletének szabályozására. A statikus és az átfolyásos diffúziós cellák egyaránt elfogadhatók. A kísérleti preparátum véges dózisú expozíciója esetén a donorkamrákat általában nem zárják le. Ugyanakkor végtelen dózis és bizonyos véges dózisok használata esetén a donorkamrák lezárhatók.

▼B

1.4.2. **Receptorfolyadék**

Előnyben kell részesíteni a fiziológiailag vezető receptorfolyadékokat, bár indokolt esetben más folyadék is használható. Meg kell határozni a receptorfolyadék pontos összetételét. Ki kell mutatni, hogy a kísérleti anyag a receptorfolyadékban megfelelő mértékben oldható, ami ahhoz szükséges, hogy ne gátolja a felszívódást. Továbbá, a receptorfolyadék nem károsíthatja a bőrpreparátum épségét. Az átfolyásos rendszerben az átfolyás sebessége nem gátolhatja a kísérleti anyagnak a receptorfolyadékban történő diffúzióját. Statikus cellarendszer esetén a folyadékot folyamatosan keverni kell, és rendszeresen mintát kell belőle venni. Ha az anyagcserét is vizsgáljuk, akkor a receptorfolyadéknak a kísérlet folyamán támogatnia kell a bőr életképességét.

1.4.3. **Bőrpreparátumok**

Emberi és állati eredetű bőr egyaránt felhasználható. Tudatában kell lenni annak, hogy az emberi bőr felhasználását nemzeti és nemzetközi etikai szempontok és feltételek szabályozzák. Bár előnyben részesítendő az élő bőr, élettelen bőrt is szabad használni, feltéve hogy kimutatható a bőr épsége. Epidermiszmembrán (enzimmel, hővel vagy kémiailag leválasztva), illetőleg dermatomával készített, hasított vastagságú bőr (jellemzően 200–400 μm vastagsággal) egyaránt felhasználható. Teljes vastagságú bőr is használható, de kerülni kell a túl vastag bőr (kb. > 1 mm) használatát, kivéve akkor, ha a kísérleti vegyszernek a bőr rétegeiben történő kimutatásához erre kifejezetten szükség van. A faj, az anatómiai helyzet és a preparátumkészítési eljárás megválasztásának indokoltnak kell lennie. Kísérleti preparátumonként minimum négy, elfogadható adatokat szolgáltató vizsgálatot kell elvégezni.

1.4.4. **A bőrpreparátum épsége**

Alapvető fontosságú, hogy a bőrt gondosan előkészítsük. A nem megfelelő kezelés következtében sérülhet a *stratum corneum*, ezért ellenőrizni kell az előkészített bőr épségét. Ha a bőr anyagcseréjét vizsgáljuk, a frissen kimetszett bőrt a lehető leggyorsabban kell felhasználni olyan feltételek között, amelyekről ismert, hogy támogatják az anyagcsere-aktivitást. Általános útmutatásként azt mondhatjuk, hogy a frissen kimetszett bőrt 24 órán belül fel kell használni, de az elfogadható tárolási időszak a metabolizációban használt enzimrendszertől és a tárolási hőmérséklettől függően változhat (13). Ha a bőrpreparátumot a használat előtt tárolták, bizonyítani kell, hogy a gátfunkció fennmaradt.

1.4.5. **Kísérleti anyag**

A kísérleti anyag az az anyag, amelynek penetrációs jellemzőit vizsgáljuk. Ideális esetben a kísérleti anyag radioaktívan jelzett.

1.4.6. **Kísérleti preparátum**

A kísérletianyag-preparátumnak (a kísérleti anyagot tartalmazó, tiszta, hígított vagy formulázott anyag, amelyet felvisznek a bőrre) meg kell egyeznie azzal az anyaggal (vagy reális helyettesítőjének kell lennie annak az anyagnak), amelynek az ember vagy más lehetséges célfajok ki lehetnek téve. A „szokásosan használt” preparátumtól való bárminemű eltérésre csak indokolt esetben van lehetőség.

▼B

1.4.7. **A kísérleti anyagok koncentrációja és összetétele**

A vizsgálatot általában a kísérleti anyag több koncentrációjával is elvégzik oly módon, hogy az egyes koncentrációk átfogják a lehetséges emberi expozíció felső határát. Ugyanígy meg kell fontolni a jellemzően előforduló formulációk mindegyikének vizsgálatát.

1.4.8. **A bőrre történő felvitel**

A szokásos feltételek között az ember vegyszereknek való expozíciója során véges dózisokkal találkozunk. Ezért az emberi expozíciót modellező alkalmazás során szokásos esetben szilárd anyag esetében a bőrön 1–5 mg/cm^2 mennyiséget, folyadék esetében pedig 10 µl/cm^2-ig terjedő mennyiséget kell használni. A mennyiséget a várható használati feltételek, a vizsgálat célkitűzései vagy a kísérleti preparátum fizikai jellemzői függvényében kell meghatározni. Például az egységnyi felületre működő nagy mennyiség modellezhető azáltal, ha a bőr felületén végtelen dózist alkalmazunk.

1.4.9. **Hőmérséklet**

A vegyszerek passzív diffúzióját (és ezért a bőrön át történő felszívódást is) befolyásolja a hőmérséklet. A diffúziós kamrát és a bőrt állandó, a normál bőr hőmérsékletéhez közeli, 32 ± 1 °C-os hőmérsékleten kell tartani. Különféle cellafelépítések különféle vízfürdőt vagy fűtöttblokk-hőmérsékletet kívánnak annak érdekében, hogy biztosítva legyen, hogy a receptor/bőr fiziológiai normaértékén legyen. A páratartalom lehetőleg 30 és 70 % között legyen.

1.4.10. **Az expozíció időtartama és a mintavétel**

A bőr kísérleti preparátumnak való expozíciója történhet a kísérlet teljes időtartama alatt vagy rövidebb időtartamok során (az emberi expozíció valamely sajátos típusának modellezéseként). A bőrről megfelelő tisztítószerrel le kell mosni a felesleges kísérleti preparátumot, és a lemosott folyadékot elemzés céljából össze kell gyűjteni. A kísérleti preparátum eltávolítására vonatkozó eljárás a várható használati feltételektől függ, és indokoltnak kell lennie. A felszívódási jellemzők megfelelő megállapításához általában 24 órás mintavételi időszak szükséges. Mivel a bőr épsége 24 óra elteltével romlásnak indulhat, a mintavételi idő rendszerint nem haladhatja meg a 24 órát. Azoknak a kísérleti anyagoknak az esetében, amelyek gyorsan behatolnak a bőrbe, ez nem feltétlenül szükséges, de a lassan behatoló kísérleti anyagok esetében hosszabb időre lehet szükség. A receptorfolyadékból történő mintavétel gyakoriságának olyannak kell lennie, amely lehetővé teszi a kísérleti anyag felszívódási folyamatának grafikus megjelenítését.

1.4.11. **Befejező eljárások**

A kísérleti rendszer minden összetevőjét elemezni kell, és meg kell határozni a visszanyerést. Ez magában foglalja a donorkamrát, a bőr felületéről lemosott folyadékot, a bőrpreparátumot és a receptorfolyadékot/kamrát. Bizonyos esetekben, külön elemzések céljából a bőrt részekre oszthatjuk: a bőr expozíciónak kitett részeire és a cella pereme alatti bőrterületre, illetőleg a *stratum corneum*ra, az epidermiszre és a dermiszre.

1.4.12. **Elemzés**

Valamennyi vizsgálat során megfelelő visszanyerést kell elérni (a radioaktivitás átlagosan 100 ± 10 %-ára kell törekedni, az esetleges eltérést indokolni kell). A receptorfolyadékban, a bőrpreparátumban, valamint a bőrfelületről és a műszerekről lemosott öblítőfolyadékban lévő kísérleti anyag mennyiségét megfelelő módszer alkalmazásával elemezni kell.

▼B

2. **ADATOK**

Be kell mutatni a receptorfolyadék elemzését, a vizsgálati rendszerben a kísérleti vegyszer eloszlását és a felszívódás jellemzőinek időbeli alakulását. Ha az expozíció során véges dózist alkalmazunk, akkor meg kell határozni a bőrről lemosott mennyiséget, a bőrrel (és ha vizsgáljuk, a különböző bőrrétegekkel) összefüggésbe hozható mennyiséget és a receptorfolyadékban jelen levő mennyiséget (sebességben, abszolút mennyiségben vagy százalékban kifejezve). A bőrön át történő felszívódás néha kizárólag a receptorfolyadékra vonatkozó adatok alapján is kifejezhető. Ugyanakkor ha a kísérleti anyag a vizsgálat végén a bőrben marad, szükség lehet a teljes felszívódott mennyiségbe való beszámítására (lásd a (3) hivatkozás 66. bekezdését). Ha az expozíció során végtelen dózist alkalmazunk, akkor az adatok lehetővé tehetik az áteresztőképességi állandó (Kp) kiszámítását. Ez utóbbi esetben a felszívódott anyag aránya nem lényeges.

3. **JEGYZŐKÖNYV**

3.1. A KÍSÉRLETI JEGYZŐKÖNYV

A kísérleti jegyzőkönyv tartalmazza a kísérlet leírásában meghatározott követelményeket, beleértve a használt vizsgálati rendszer indoklását, valamint a következőket:

Kísérleti anyag:

— fizikai természete, fizikai-kémiai tulajdonságai (legalább a molekulatömeg és a log P_{ow}), tisztasága (radiokémiai tisztaság),

— azonosítási adatok (pl. tételszám),

— oldhatóság a receptorfolyadékban.

Kísérleti preparátum:

— formuláció és megválasztásának indoklása,

— homogenitás.

Kísérleti körülmények:

— a bőr eredete és helyzete, az előkészítés módszere, a felhasználást megelőző tárolás körülményei, az esetleges előkezelés (tisztítás, antibiotikumos kezelés stb.), a bőr épségére vonatkozó vizsgálatok, anyagcsere-állapot, a megválasztás indoklása,

— a cella felépítése, a receptorfolyadék összetétele, a receptorfolyadék áramlási sebessége vagy a mintavételi időpontok és eljárások,

— a kísérleti preparátum adagolása és az alkalmazott dózis mennyiségi meghatározása,

— az expozíció időtartama,

— a kísérleti preparátum bőrről történő eltávolításának részletei, pl. a bőr öblítése,

— a bőr elemzésére vonatkozó adatok és a bőrön belüli eloszlás leírása céljából végzett részekre osztás részletei,

▼B

— cella- és műszermosási eljárások,

— a mennyiségi elemzés módszerei, kinyerési eljárások, kimutathatósági határok és az értékelési módszer hitelesítése.

Eredmények:

— a teljes visszanyerés a kísérlet során (alkalmazott dózis ≡ bőrmosás + bőr + receptorfolyadék + cellamosás),

— minden egyes rekeszben az egyes cellavisszanyerések táblázatos összefoglalása,

— felszívódási profil,

— táblázatba foglalt felszívódási adatok (sebességben, abszolút mennyiségben vagy százalékban kifejezve).

Az eredmények szöveges értékelése.

Következtetések.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(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 Application*s, 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 Application*s. 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 a*l. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

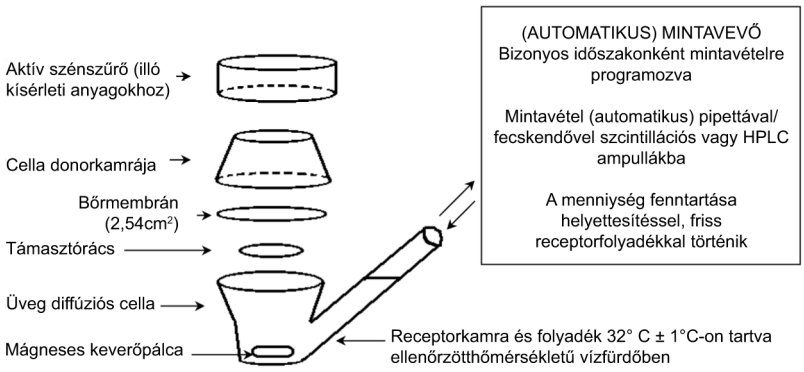
(11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

(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.

1. ábra

Példa a statikus diffúziós cella felépítésére a bőrön át történő felszívódás *in vitro* vizsgálatához



▼M8

B.46. *IN VITRO* BŐRIRRITÁCIÓ: REKONSTRUÁLT EMBERI FELHÁMMODELLEN VÉGZETT VIZSGÁLATI MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 439. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A bőrirritáció a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően 4 órán belül megjelenő, visszafordítható bőrkárosodás [az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS)] (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet) ([1]) meghatározottak szerint. Ez a vizsgálati módszer olyan *in vitro* eljárást biztosít, amely lehetővé teszi az ENSZ által kidolgozott GHS és a CLP-rendelet szerinti 2-es kategóriának megfelelő, irritációt okozó vegyi anyagok (anyagok és keverékek) jelentette veszély meghatározását (2). Azokban a régiókban, amelyekben nem alkalmazzák az ENSZ GHS szerinti opcionális 3. kategóriát (enyhe irritáló hatású anyagok), e vizsgálati módszert a kategóriába nem sorolt vegyi anyagok azonosítására is használhatják. Ezért a szabályozási keret és a használatban lévő osztályozási rendszer függvényében e vizsgálati módszer egyaránt használható az *in vivo* bőrirritációs vizsgálatokat önállóan helyettesítő vizsgálatként és valamely vizsgálati stratégia keretében alkalmazott részlegesen helyettesítő vizsgálatként a vegyi anyagok bőrirritációs hatásának meghatározására (3).

2. A bőrirritáció felmérése jellemzően kísérleti állatokon történő vizsgálatot foglal magában (az OECD eredetileg 1981-ben elfogadott, majd 1992-ben, 2002-ben és 2015-ben felülvizsgált 404. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű B.4. vizsgálati módszer alkalmazásával) (4). A korrozivitás vizsgálata terén három validált *in vitro* vizsgálati módszert fogadtak el: (az OECD 430. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) B.40. uniós vizsgálati módszert, (az OECD 431. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) B.40bis. vizsgálati módszert és (az OECD 435. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) B.65. vizsgálati módszert (5) (6) (7). A bőrkorróziós és bőrirritációs vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló OECD-iránymutatás több, információforrásokat és adatelemző eszközöket csoportosító modult ismertet, továbbá iránymutatást nyújt arra nézve, i. hogyan integrálhatók és használhatók az ismert vizsgálati és nem vizsgálati eredetű adatok a vegyi anyagok potenciális bőrirritációs és bőrkorróziós hatásainak felmérésére, és ii. javaslatot tesz egy, a további vizsgálatok szükségessége esetén alkalmazható megközelítésre (3).

3. Ez a vizsgálati módszer a bőrirritációval mint az emberi egészség károsodásának egyik végpontjával foglalkozik. Ez a módszer rekonstruált emberi felhám (RhE) *in vitro* vizsgálati rendszerén alapul, amely nagy hasonlósággal modellezi az emberi bőr felső rétegének, azaz a felhámnak (epidermisznek) biokémiai és fiziológiai tulajdonságait Az RhE vizsgálati rendszer nem transzformált emberi keratinocitákat alkalmaz sejtforrásként, amelyekből rekonstruálnak egy szövettani és sejtfelépítés szempontjából reprezentatív felhámmodellt. A hasonló és módosított RhE-alapú vizsgálati módszerek validálásának és értékelésének elősegítése érdekében rendelkezésre állnak teljesítményszabványok, az OECD 34. iránymutatásában lefektetett elvekkel összhangban (8) (9). A módszerrel egyenértékű, eredetileg 2010-ben elfogadott vizsgálati iránymutatás 2013-as átdolgozott változatába belefoglaltak további RhE-modelleket, 2015-ös átdolgozott kiadása pedig kitér az IATA-iránymutatásra és bevezet egy, az életképesség mérésére szolgáló alternatív eljárást.

4. Az RhE vizsgálati rendszeren (érzékenysége 80 %, specificitása 70 % és pontossága 75 %) alapuló négy kereskedelmi forgalomban kapható *in vitro* vizsgálati modellen végeztek elővalidálási, optimalizálási és validálási vizsgálatokat (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). E vizsgálati iránymutatás magában foglalja ezt a

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

▼M8

négy vizsgálati modellt, felsorolásuk a 2. mellékletben található, amely tájékoztatást nyújt az adott vizsgálati módszerek validálásához alkalmazott validálási vizsgálat típusáról is. Ahogyan az a 2. mellékletben is megjegyzésre került, e vizsgálati módszer és a teljesítményszabványok (8) a validált referenciamódszer alapján kerültek kidolgozásra.

5. Az adatok OECD-megállapodás szerinti kölcsönös elfogadása csak a teljesítményszabványoknak (8) megfelelően validált vizsgálati modellek esetében lesz garantált, ha a vizsgálati modelleket az OECD felülvizsgálta és elfogadta. Az e vizsgálati módszer és az annak megfelelő OECD vizsgálati iránymutatás részét képező vizsgálati modellek egységesen használhatók arra, hogy eleget tegyenek az *in vitro* bőrirritációs vizsgálati módszerekből származó vizsgálati eredményekre vonatkozó nemzeti követelményeknek, ugyanakkor biztosítják az adatok kölcsönös elfogadásának előnyeit.

6. A dokumentumban alkalmazott fogalmak meghatározása az 1. függelékben található.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

7. A vizsgálati módszer korlátai közé tartozik – ahogyan az az RhE vizsgálati módszereket értékelő és jellemző teljes körű előretekintő validálási vizsgálatból kiderült (16) –, hogy nem teszi lehetővé a vegyi anyagok ENSZ GHS szerinti opcionális 3. kategóriába (enyhe irritáló hatású anyagok) sorolását (1). Ezért a vizsgálati módszer jövőbeni használatát a tagállamok szabályozási kerete fogja meghatározni. Az EU a 3. kategóriát nem foglalta bele a CLP-rendeletbe. Egyetlen bőrexpozíció után a bőrt ért helyi hatások teljes kiértékeléséhez a vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről szóló OECD-iránymutatást kell tanulmányozni (3). Elfogadott tény, hogy az emberi bőr használatára nemzeti és nemzetközi etikai megfontolások és feltételek vonatkoznak.

8. Ez a vizsgálati módszer a bőrirritációval mint az emberi egészség károsodásának egyik végpontjával foglalkozik. Bár ez a vizsgálati módszer nem nyújt megfelelő információt a bőrkorrózióról, megjegyzendő, hogy a bőrkorrózió vizsgálatára irányuló (az OECD 431. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) B.40bis. módszer ugyanezen a rekonstruált emberi felhámmodelles vizsgálati rendszeren alapul, noha más protokollt alkalmaz (6). Ez a vizsgálati módszer emberi keratinsejteket tartalmazó rekonstruált emberi felhámmodelleken alapul, tehát a vizsgált faj célszervének *in vitro* vizsgálatáról van szó. Továbbá közvetlenül lefedi az irritáció során *in vivo* zajló gyulladásos kaszkád/hatásmechanizmus kezdeti lépését (körülírt sérülést eredményező sejt- és szövetkárosodás). E vizsgálati módszer validálási eljárása során a vegyi anyagok széles körét vizsgálták, és a validálási vizsgálat adatbázisa összesen 58 vegyi anyagra terjedt ki (16) (18) (23). A vizsgálati módszer szilárd anyagokra, folyadékokra, félszilárd anyagokra és viaszos anyagokra alkalmazandó. A folyadékok lehetnek vizesek vagy nem vizesek; a szilárd anyagok lehetnek vízben oldódóak vagy oldhatatlanok. Ahol megoldható, a szilárd anyagokat alkalmazásuk előtt finom porrá kell őrölni; a mintát előzetesen nem szükséges más módon kezelni. Gázokat és aeroszolokat hitelesítési vizsgálat keretében még nem vizsgáltak (29). Bár elképzelhető, hogy ezek is vizsgálhatók a rekonstruált emberi felhámmodelles technikával, a jelenlegi vizsgálatimódszer-leírás nem engedi meg gázok és aeroszolok vizsgálatát.

9. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény. Mivel azonban a keverékek kategóriák és összetételek széles körét fedik le, és jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a keverékek vizsgálatára vonatkozóan, azokban az esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a vizsgálati módszer valamely konkrét keverékkategó-

▼M8

riára
nem alkalmazható (pl. az Eskes és társai, 2012 által javasolt stratégia alapján (30)), a vizsgálati módszer az adott keverékkategóriára nem alkalmazható. Hasonló elővigyázatossággal kell eljárni azokban az esetekben, amikor egyes kémiai osztályokról vagy fizikai-kémiai tulajdonságokról bizonyosodik be, hogy e vizsgálati módszer keretében nem alkalmazhatók.

10. Azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek ugyanabban a tartományban nyelik el a fényt, mint az MTT-formazán, és azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek közvetlenül is képesek redukálni az MTT vitális festéket (MTT-formazánná), befolyásolhatják a sejtek életképességének mérését, ennek korrigálása érdekében adaptált kontrollvizsgálatokra van szükség (lásd a 28–34. pontot).

11. Ha a besorolás egyértelmű, három szövetreplikátum vizsgálatából álló egyszeri vizsgálatmenetnek elegendőnek kell lennie az adott vizsgálati vegyi anyag esetében. Határértéken lévő eredmények esetében azonban, ha például az egyes szövetreplikátumok eredményei nem egyeznek és/vagy az átlagos százalékos életképesség 50 ± 5 %, megfontolandó egy második vizsgálatmenet lefolytatása, és ha az első és a második vizsgálatmenet eredményei különbözőek, egy harmadiké is.

A VIZSGÁLAT ELVE

12. A vizsgálati vegyi anyagot egy olyan nem transzformált emberi epidermális keratinsejtekből képződött, háromdimenziós emberi felhámmodellre viszik fel topikálisan, amelyeket úgy tenyésztettek ki, hogy többrétegű, erősen differenciált emberi felhámot (epidermiszt) alkossanak. Ez szervezett bazális, spinózus és granuláris sejtrétegekből, valamint többrétegű szarurétegből (*stratum corneum*) áll, amelyek intercellulárisan lipid kettősréteget tartalmaznak, megtalálhatók a fő lipidcsoportok, amik analógok az *in vivo* megtalálható lipidcsoportokkal.

13. A vegyi anyagok által előidézett bőrirritáció, amely főként bőrpírt és ödémát okoz, egy kaszkád jellegű folyamat eredménye, amelynek első lépéseként a vegyi anyagok áthatolnak a *stratum corneum*on, ahol károsíthatják az alatta lévő, keratinsejtekből és más bőrsejtekből álló rétegeket. A károsodott sejtek vagy gyulladást okozó anyagokat bocsátanak ki, vagy egy gyulladásos kaszkádot indítanak el, amelyek szintén az irhában lévő sejtekre hatnak – főként a vérerek stromális és endoteliális sejtjeire. A megfigyelt bőrpírt és ödémát az endoteliális sejtek tágulása és fokozott permeabilitása idézi elő (29). Mivel az *in vitro* vizsgálati rendszerben nincsenek vérerek, a rekonstruált emberi felhámmodellen alapuló vizsgálati módszerek a kaszkád kiváltó eseményeit, vagyis a sejt-, illetve szövetkárosodást mérik (16), (17), a sejtek életképessége alapján.

14. A rekonstruált emberi felhámmodellekben lévő sejtek életképességét az MTT [3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid, tiazolil kék; CAS-száma: 298–93–1)] vitális festék enzimatikus úton kék formazán kristállyá történő átalakulása alapján mérik, amelyet a szövetekből történő kivonás után mennyiségileg meghatároznak (31). Az irritatív hatású anyagokat azon képességük alapján azonosítják, hogy a sejtek életképességét meghatározott határérték alá (azaz az ENSZ GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategóriájú anyagok esetében ≤ 50 % alá) csökkentik. A szabályozási kerettől és a vizsgálati módszer alkalmazhatóságától függően a határérték feletti sejtéletképességet eredményező vizsgálati vegyi anyagok, amelyek a definált küszöbérték feletti értéket mutatnak nem irritálónak tekinthetők (vagyis 50 % feletti érték, nincs kategóriába sorolva).

▼M8

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

15. Az e vizsgálati módszer alá tartozó (2. függelékben ismertetett) négy validált vizsgálati modell rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1. táblázatban felsorolt tíz jártassági tesztanyag használatával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Az olyan helyzetekben, mint amikor a jegyzékben szereplő valamely anyag nem áll rendelkezésre, megfelelő *in vivo* és *in vitro* referenciaadatokkal rendelkező más – például a referencia-vegyianyagok jegyzékében feltüntetett (8) – anyag is használható, amennyiben a kiválasztási kritériumok megegyeznek az 1. táblázatban foglaltakkal. Más jártassági tesztanyag alkalmazását meg kell indokolni.

16. A jártassági vizsgálat részeként ajánlott, hogy a felhasználók a rekonstruált emberi felhámmodell gyártója által meghatározottak szerint, átvétel után ellenőrizzék a szövetek barrierjellemzőit. Ez különösen fontos, ha a szöveteket nagy távolságra/hosszú ideig szállították. Ha egy vizsgálati módszert már sikeresen igazoltak, valamint jártasságot szereztek az alkalmazásában és bizonyították azt, ilyen jellegű ellenőrzéseket nem szükséges rutinszerűen végezni. Ha azonban egy vizsgálati módszert rutinszerűen alkalmaznak, a barrierjellemzőket javasolt továbbra is rendszeres időközönként ellenőrizni.

1. táblázat

Jártassági tesztanyagok ([1])

Anyag	CAS-szám	*In vivo* eredmény ([2])	Halmazállapot	ENSZ GHS szerinti kategória
KATEGÓRIÁBA NEM SOROLT ANYAGOK (ENSZ GHS szerint „nem besorolt”)				
naftalin-ecetsav	86-87-3	0	Szilárd	Kategória nélküli
izopropanol	67-63-0	0,3	Folyadék	Kategória nélküli
metil-sztearát	112-61-8	1	Szilárd	Kategória nélküli
heptil-butirát	5870-93-9	1,7	Folyadék	Kategória nélküli (*Opcionális 3. kategória*) ([3])
hexil-szalicilát	6259-76-3	2	Folyadék	Kategória nélküli (*Opcionális 3. kategória*) ([3])
KATEGORIZÁLT ANYAGOK (ENSZ GHS szerinti 2. kategória)				
ciklámen-aldehid	103-95-7	2,3	Folyadék	2. kategória
1-brómhexán	111-25-1	2,7	Folyadék	2. kategória
kálium-hidroxid (5 %-os vizes oldat)	1310-58-3	3	Folyadék	2. kategória
1-metil-3-fenil-1-piperazin	5271-27-2	3,3	Szilárd	2. kategória
heptanál	111-71-7	3,4	Folyadék	2. kategória

([1]) A jártassági tesztanyagok az anyagok olyan csoportját alkotják, amelyet felhasználtak a validálási vizsgálat során, kiválasztásuk pedig az alábbi kritériumok alapján történt: i. a vegyi anyagok kereskedelmi forgalomban kaphatók; ii. lefedik a Draize-féle irritációs pontértékek teljes tartományát (a nem irritálótól az erősen irritálóig); iii. jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek; iv. reprezentatívak a validálási folyamat során alkalmazott kémiai funkcionalitás tekintetében; v. több vizsgálat során és több laboratóriumban megismételhető *in vitro* eredményeket biztosítottak; vi. az *in vitro* vizsgálatokban megfeleltek az előrejelzéseknek, és vii. nem rendelkeznek rendkívül toxikus profillal (például karcinogén hatással vagy reproduktív toxicitással), valamint nem kapcsolódnak hozzájuk elrettentő mértékű ártalmatlanítási költségek.

([2]) Az *in vivo* pontszám összhangban van a B.4. vizsgálati módszerrel (4).

([3]) E vizsgálati módszer alapján az ENSZ GHS szerinti opcionális 3. kategóriába tartozó anyagok (enyhe irritáló hatású anyagok) (1) „kategória nélküli” anyagoknak minősülnek.

▼M8

ELJÁRÁS

17. Az alábbiakban ismertetjük a bőrirritáció felmérésére szolgáló RhE vizsgálati módszer összetevőit és eljárásait (az egyes vizsgálati modellekhez kapcsolódó paraméterekről a 3. függelék nyújt további tájékoztatást). A vizsgálati módszernek megfelelő négy modellhez rendelkezésre állnak szabványműveleti eljárások (32) (33) (34) (35).

A RHE VIZSGÁLATI MÓDSZER ÖSSZETEVŐI

Általános feltételek

18. Az epitélium felépítéséhez nem transzformált emberi keratinsejteket kell használni. Élő epitélsejtek több rétegének (bazális réteg, *stratum spinosum, stratum granulosum*) kell jelen lennie a funkcionális *stratum corneum* alatt. A *stratum corneum*nak többrétegűnek kell lennie, és tartalmaznia kell az elengedhetetlenül szükséges lipidprofilt, hogy nagy ellenálló képességgel rendelkező funkcionális barriert képezzen a citotoxikus referencia-vegyianyagok, pl. a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) vagy a Triton X-100 gyors áthatolása ellen. A barrierfunkciót bizonyítani kell, ennek értékeléséhez meghatározható az a referencia-vegyianyag koncentráció, amely meghatározott idejű expozíciót követően 50 %-kal csökkenti a szövetek életképességét (IC_{50}), vagy az az expozíciós idő, amely alatt egy adott, állandó koncentrációjú referencia-vegyianyag hatására a sejtek életképessége 50 %-kal csökken (ET_{50}). A rekonstruált emberi felhámmodell folyadékzáró tulajdonságainak meg kell akadályozni, hogy az anyag passzáljon a *stratum corneum* körül az élő szövetbe, amely a bőr expozíciójának rossz modellezését eredményezné. A rekonstruált emberi felhámmodellnek baktérium-, vírus-, mikoplazma- és gombafertőzéstől mentesnek kell lennie.

Funkcionális feltételek

Életképesség

19. Az életképesség számszerű mérése MTT-vizsgálattal történik (31). A rekonstruált ember felhám szövetkonstrukciójának élő sejtjei képesek az MTT vitális festéket kék MTT-formazán kristályokká redukálni, amelyeket azután izopropanol (vagy hasonló oldószer) használatával kivonják a szövetből. Az extraháló oldószer optikai sűrűségének (OD) eléggé alacsonynak, azaz 0,1 alattinak kell lennie. A kivont MTT-formazán mennyisége meghatározható hagyományos abszorbancia (OD) méréssel vagy HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással (36). A rekonstruált emberi felhámmodell felhasználóinak biztosítaniuk kell, hogy az alkalmazott RhE-modell minden egyes tétele megfeleljen a negatív kontrollra vonatkozóan meghatározott kritériumoknak. A rekonstruált emberi felhámmodell előállítójának/forgalmazójának meg kell határoznia a negatív kontroll során nyert OD-értékek (bőrirritációs vizsgálati módszer körülményei alatti) elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékeket). A vizsgálati módszerhez kapcsolódó négy validált RhE vizsgálati modell elfogadhatósági tartományát a 2. táblázat tartalmazza. A HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás alkalmazása esetén a negatív kontroll elfogadhatósági feltételeként a 2. táblázatban szereplő negatív kontrollra vonatkozó OD-tartományok szolgálnak. Dokumentálni kell, hogy a negatív kontrollal kezelt szövetek stabilak a tenyészetben (hasonló életképességi értékeket adnak) a vizsgálat során alkalmazott expozíciós időszak alatt.

2. táblázat

Negatív kontrollra vonatkozó OD-értékek elfogadhatósági tartománya a vizsgálati módszer alá tartozó vizsgálati modellek alkalmazása esetén

	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8

▼M8

	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Barrierfunkció

20. A *stratum corneum*nak és lipidprofiljának az IC_{50} vagy ET_{50} alapján végzett becslések szerint (3. táblázat) megfelelő ellenálló képességgel kell rendelkeznie ahhoz, hogy meg tudja akadályozni a citotoxikus referencia-vegyianyagok (pl. a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) vagy a Triton X-100) gyors áthatolását.

Morfológia

21. A rekonstruált emberi felhámmodellen szövettani vizsgálatot kell végezni a humán epidermiszszerű szerkezet (beleértve a többrétegű *stratum corneum*) igazolására.

Reprodukálhatóság

22. A vizsgálati módszer alkalmazása során végzett pozitív és negatív kontrollok eredményeinek igazolniuk kell a módszer időbeni megismételhetőségét.

Minőség-ellenőrzés

23. A rekonstruált emberi felhámmodell csak abban az esetben alkalmazható, ha előállítója/forgalmazója igazolja, hogy az alkalmazott RhE-modell minden egyes tétele megfelel a gyártás utáni felszabadításra vonatkozóan meghatározott feltételeknek, amelyek közül az *életképességre* (19. pont), a *barrierfunkcióra* (20. pont) és a *morfológiára* (21. pont) vonatkozó kritériumok a leglényegesebbek. Ezeket az adatokat a vizsgálati módszer felhasználóinak rendelkezésére kell bocsátani, hogy ezeket az információkat fel tudják tüntetni a vizsgálati jelentésben. Az IC_{50} és az ET_{50} eljárás elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékét) a rekonstruált emberi felhámmodell előállítójának/forgalmazójának kell meghatároznia. Az irritáló hatás besorolásának megbízható előrejelzéseként kizárólag minősített szöveteken végzett vizsgálatok eredményei fogadhatók el. Az e vizsgálati iránymutatáshoz kapcsolódó négy vizsgálati modell elfogadhatósági tartományát a 3. táblázat ismerteti.

3. táblázat

Minőség-ellenőrzés tételenkénti, kibocsátási kritériumai az e vizsgálati módszer alá tartozó vizsgálati modellek alkalmazása esetén

	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiSkin™ (SM) (18 órás kezelés nátrium-dodecil-szulfáttal (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 óra	ET_{50} = 8,7 óra
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 óra	ET_{50} = 10,0 óra
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 órás kezelés nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS)) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

▼M8

A vizsgálati vegyi anyag és a kontrollként szolgáló vegyi anyagok alkalmazása

24. Minden vizsgálatmenetben valamennyi vizsgálati vegyi anyaghoz és kontrollhoz legalább három szövetreplikátumot kell használni. Folyékony és szilárd anyagok esetében egyaránt megfelelő mennyiségű vizsgálati vegyi anyagot kell alkalmazni, hogy az egyenletesen fedje az epidermisz felszínét, azaz 26 és 83 μl/cm^2 vagy mg/cm^2 közötti mennyiséget (lásd a 3. függeléket), ugyanakkor el kell kerülni a végtelen dózis alkalmazását. Szilárd anyagok esetében alkalmazásuk előtt az epidermisz felületét ionmentesített vagy desztillált vízzel be kell nedvesíteni, hogy jobb legyen az érintkezés a vizsgálati vegyi anyag és az epidermisz felszíne között. A szilárd anyagokat, amikor csak lehetséges finom por alakban kell vizsgálni. Bizonyos esetekben a szétterítés megkönnyítésére nejlonháló használható (lásd a 3. függeléket). Az expozíciós idő lejártával a vizsgálati vegyi anyagot vizes alapú pufferrel vagy 0,9 %-os NaCl-dal óvatosan le kell mosni az epidermisz felületéről. Az alkalmazott RhE vizsgálati modelltől függően az expozíciós időszak 15 és 60 perc között, az inkubációs hőmérséklet pedig 20 és 37 °C között változhat. Az expozíciós időt és hőmérsékletet minden egyes RhE vizsgálati módszerre optimalizálták, hogy azok tükrözzék a vizsgálati modellek különböző belső tulajdonságai (pl. barrierfunkcióját) (lásd a 3. függeléket).

25. Minden vizsgálatmenetben párhuzamos negatív és pozitív kontrollokat kell végezni annak bizonyítására, hogy a szövetek életképessége (negatív kontrollok esetében), barrierfunkciója és az abból fakadó érzékenysége (pozitív kontrollok esetében) egy meghatározott történeti elfogadhatósági tartományba esik. A javasolt pozitív kontrollanyag nátrium-dodecil-szulfát (SDS) 5 %-os vizes oldata. A javasolt negatív kontrollanyag a víz vagy a foszfátpuffert tartalmazó sóoldat (PBS).

A sejtek életképességének mérése

26. A vizsgálati eljárás szerint fontos, hogy az életképességi mérést ne azonnal a vizsgálati vegyi anyaggal végzett expozíció után végezzék, hanem friss tápközegben, megfelelő hosszúságú inkubációs utókezelési időszakot követően. Ez az időszak egyaránt lehetővé teszi az enyhe irritatív hatás utáni felépülést, valamint az egyértelmű citotoxikus hatások megjelenését. A vizsgálati módszer alapjául szolgáló RhE-alapú vizsgálati modellek közül kettőnek az esetében elvégzett optimalizálási vizsgálat során a 42 órás kezelés utáni inkubációs időszak bizonyult optimálisnak (11) (12) (13) (14) (15).

27. Az MTT-vizsgálat egy szabványosított kvantitatív módszer, amelyet e vizsgálati módszer során a sejtek életképességének méréséhez kell alkalmazni. A vizsgálat kompatibilis a háromdimenziós szövetkonstrukcióban történő használattal. A szövetmintát 3 órára megfelelő koncentrációjú (például 0,3–1 mg/ml) MTT-oldatba kell helyezni. Az MTT-t az élő sejtek kék formazánná alakítják. A kicsapódott kék formazán terméket azután oldószer (pl. izopropanol, savas izopropanol) használatával eltávolítják a szövetből, és az OD-értéket 570 nm-es hullámhosszon (a maximumhoz képest ± 30 nm-es eltérés lehetséges), vagy egy HPLC/UPLC spektrofotométeres eljárás útján (lásd a 34. pontot) (36) meghatározzák a formazán koncentrációját.

28. A vizsgálati vegyi anyag optikai tulajdonságai vagy az MTT-re gyakorolt kémiai hatása folytán (pl. a vegyi anyagok meggátolhatják vagy megfordíthatják a színképződést, vagy éppen fokozhatják azt) befolyásolhatja a vizsgálatot, ami az életképesség helytelen megbecsüléséhez vezet. Ez következhet be, amikor egy adott vizsgálati vegyi anyagot mosással nem távolítottak el teljesen a szövetből, vagy amikor az anyag áthatol az epidermiszen. Ha a vizsgálati vegyi anyag közvetlen hatást gyakorol az MTT-re (pl. MTT-redukáló), természetes állapotában is színes, vagy a szövetkezelés

▼M8

során elszíneződik, további kontrollokat kell alkalmazni annak kimutatására és korrigálására, hogy a vizsgálati vegyi anyag befolyásolja az életképesség mérésének módját (lásd a 29. és 33. pontot). A vizsgálati módszer alá tartozó négy validált modell szabványműveleti eljárásában megtalálható annak részletes leírása, hogyan kell korrigálni a közvetlen MTT-redukáló hatást és a színezőanyagok okozta zavaró hatást (32) (33) (34) (35).

29. A közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező anyagok azonosítása érdekében minden vizsgálati vegyi anyagot friss MTT-oldatba kell helyezni. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó MTT-keverék színe kékre/lilára változik, a vizsgálati vegyi anyag feltételezhetően közvetlenül redukálja az MTT-t, ezért kiegészítő funkcionális ellenőrzést kell végezni elhalt rekonstruált emberi felhámszöveteken, független vizsgálat keretében, hagyományos abszorbancia (OD) mérés, illetve HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján. E kiegészítő funkcionális ellenőrzés során elhalt szöveteket használnak, amelyek reziduális metabolikus aktivitással rendelkeznek csupán, ugyanakkor az élő szövetekhez hasonló módon abszorbeálják a vizsgálati vegyi anyagot. Az egyes MTT-redukáló hatású vizsgálati vegyi anyagokkal legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot azzal a céllal, hogy egy nem specifikus MTT-redukciót (NSMTT) hozzanak létre (32) (33) (34) (35). A független vizsgálatok/vizsgálatmenetek számától függetlenül vizsgálati vegyi anyagonként elegendő egyetlen NSMTT-kontrollt végezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez az MTT-redukáló anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból levonják az ugyanazon MTT-redukáló anyaggal kezelt elhalt szövetekkel kapott nem specifikus MTT-redukció arányát, amelyet a vizsgálattal párhuzamosan végzett negatív kontrollal korrigálva számítanak ki (NSMTT-arány).

30. Annak érdekében, hogy meghatározható legyen a színes vizsgálati vegyi anyagok, illetve a vízzel vagy izopropanollal való érintkezés következtében elszíneződött vizsgálati vegyi anyagok potenciális zavaró hatása, és dönteni lehessen a kiegészítő kontrollok szükségességéről, el kell végezni a vizsgálati vegyi anyag spektrumelemzését vízben (expozíciós környezet) és/vagy izopropanolban (extraháló oldat). Amennyiben vízben és/vagy izopropanolban a vizsgálati vegyi anyag 570 ± 30 nm-es tartományban nyeli el a fényt, további színezőanyag-kontrollokra van szükség, illetve alternatív megoldásként HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárást lehet végezni, amelynek alkalmazásakor ezek a kontrollok nem szükségesek (lásd a 33. és 34. pontot). Hagyományos abszorbancia (OD) mérés esetén az egyes zavaró hatású színes vizsgálati vegyi anyagokkal legalább két élő szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot, de az MTT inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat, hogy létrehozzanak egy nem specifikus elszíneződés ($NSC_{élő}$) kontrollt. Az élő szövetekre jellemző biológiai változékonyságból kifolyólag az $NSC_{élő}$ kontrollt a színes vizsgálati vegyi anyag vizsgálatával párhuzamosan kell elvégezni, több vizsgálat esetén pedig (minden egyes vizsgálatmenetnél) minden vizsgálattal egyidejűleg független $NSC_{élő}$ kontrollt kell végezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT-oldatban inkubált élő szövetek életképességi arányából levonják a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyagnak kitett és MTT nélküli közegben inkubált élő szövetek nem specifikus elszíneződésének arányát, amelyet a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan vizsgáltak ($NSC_{élő}$ arány).

31. Azon hagyományos abszorbancia (OD) méréssel értékelt vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek egyaránt okoznak közvetlen MTT-redukciót (lásd a 29. pontot) és színinterferenciát (lásd a 30. pontot), az előző pontokban ismertetett NSMTT és $NSC_{élő}$ kontrollok mellett szükség van egy harmadik fajta kontrollvizsgálatra is. Általában ez a helyzet áll elő az MTT-vizsgálatot zavaró sötét színű (pl. kék, lila, fekete) vizsgálati

▼M8

vegyi anyagoknál, mivel saját színük akadályozza, hogy a 29. pontban leírtak szerint értékelni lehessen közvetlen MTT-redukáló hatásukat. Ezek a vizsgálati vegyi anyagok egyaránt kötődhetnek élő és elhalt szövetekhez, ezért az NSMTT-kontroll nem csupán a vizsgálati vegyi anyag által előidézett közvetlen MTT-redukáló hatást korrigálja, hanem az anyag elhalt szövetekhez való kötődéséből eredő színinterferenciát is. Ez viszont a színinterferencia kétszeri korrekciójához vezethet, mivel az NSCélő kontroll már korrigálja a vizsgálati vegyi anyag élő szövetekhez való kötődéséből fakadó színinterferenciát. A színinterferencia esetleges kétszeri korrekciójának kiküszöbölése érdekében szükség van egy harmadik kontrollra, amely az elhalt szövetek esetében méri a nem specifikus elszíneződést (NSC_{elhalt}). E kiegészítő kontroll során a vizsgálati vegyi anyaggal legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot, de az MTT inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat. A független vizsgálatok/vizsgálatmenetek számától függetlenül vizsgálati vegyi anyagonként elegendő egyetlen NSCelhalt kontroll, azt azonban az NSMTT-kontrollal egyidejűleg, és ha megoldható, ugyanazon szövettételen kell elvégezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból levonják az NSMTT-arányt és az NSCélő arányát, majd hozzáadják a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT nélküli közegben inkubált elhalt szövetekkel kapott nem specifikus elszíneződési arányt, amelyet a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan végzett negatív kontrollhoz viszonyítva számítanak ki (NSCelhalt arány).

32. Fontos megjegyezni, hogy a nem specifikus MTT-redukció és a nem specifikus színinterferencia a spektrofotométer linearitási tartománya fölé növelheti a szövetkivonat leolvasott értékeit. Ebből kifolyólag minden laboratóriumnak kereskedelmi forgalomban kapható MTT-formazán (CAS-száma: 57360-69-7) segítségével meg kell határoznia spektrofotométerének linearitási tartományát, mielőtt megkezdené a vizsgálati vegyi anyagok szabályozási célú vizsgálatát. A spektrofotométert használó hagyományos abszorbancia (OD) mérés alkalmas a közvetlen MTT-redukáló hatással bíró és színinterferenciát okozó vizsgálati vegyi anyagok értékelésére, amikor a szövetkivonatok vizsgálati vegyi anyaggal kapott, közvetlen MTT-redukció és/vagy színinterferencia tekintetében nem korrigált OD értékei a spektrofotométer linearitási tartományán belül vannak, illetve amikor a vizsgálati vegyi anyaggal kapott nem korrigált életképességi arány már ≤ 50 %. Mindazonáltal a negatív kontroll 50 %-ával egyező vagy annál nagyobb NSMTT-arányt és/vagy $NSC_{élő}$ arányt előidéző vizsgálati vegyi anyagok eredményei óvatosan értelmezendők, mivel ezt a határértéket használják a kategorizált és nem kategorizált vegyi anyagok megkülönböztetésére (lásd a 36. pontot).

33. Azon színes vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek nagy mértékben befolyásolják az MTT-vizsgálatot, és ezért hagyományos abszorbancia (OD) méréssel nem vizsgálhatók, az MTT-formazán HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással történő meghatározását lehet alkalmazni (lásd a 34. pontot) (36). A HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer lehetővé teszi, hogy az MTT-formazánt mennyiségi meghatározása előtt elkülönítsék a vizsgálati vegyi anyagtól (36). Ezért HPLC/UPLC spektrofotometriás módszer használata esetén a vizsgálati vegyi anyagtól függetlenül soha nincs szükség $NSC_{élő}$ és NSC_{elhalt} kontrollra. Az NSMTT-kontroll ugyanakkor alkalmazandó, ha a vizsgálati vegyi anyag gyaníthatóan közvetlenül redukálja az MTT-t, vagy a színe miatt közvetlen MTT-redukáló hatását nem lehet felmérni (a 29. pontban ismertetett módon). Amennyiben HPLC/UPLC spektrofotometriásan mérik az MTT-formazánt, a szövetek életképességi aránya a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott MTT-formazán csúcsterület és a párhuzamos negatív kontrollal kapott MTT-formazán csúcsterület aránya lesz. A közvetlen MTT-redukáló hatással

▼M8

rendelkező vizsgálati vegyi anyagok esetében a szövetek valódi életképességét úgy számítják ki, hogy a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból kivonják az NSMTT-arányt. Végül megjegyzendő, hogy azok a közvetlen MTT-redukáló hatású, esetleg színinterferenciát is okozó vegyi anyagok, amelyek a kezelést követően visszamaradnak a szövetben és olyan erős MTT-redukáló hatással bírnak, hogy a vizsgált szövetkivonatok OD-értéke (hagyományos OD mérés esetén), illetve csúcsterülete (HPLC/UPLC spektrofotometriás mérés esetén) kívül esik a spektrofotométer linearitási tartományán, nem értékelhetők, bár ilyen csak igen ritka esetben fordul elő.

34. A HPLC/UPLC spektrofotometria bármely típusú vizsgálati vegyi anyagnál (színes, nem színes, MTT-redukáló vagy nem MTT redukáló hatású) alkalmazható az MTT-formazán mérésére (36). A HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszerek sokfélesége miatt szükség van arra, hogy a szövetkivonatok MTT-formazán-tartalmának meghatározása előtt igazolják a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítését azzal, hogy eleget tesznek az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelete (FDA) által az iparág számára kiadott, bioanalitikus módszerek validálására vonatkozó iránymutatásban (36) (37) szereplő standard minősítési paramétereken alapuló elfogadhatósági kritériumoknak. E kulcsfontosságú paraméterekről és elfogadhatósági kritériumokról a 4. függelék nyújt tájékoztatást. Amint eleget tettek a 4. függelékben meghatározott elfogadhatósági kritériumoknak, a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítettnek tekintendő, és alkalmas arra, hogy az itt leírt vizsgálati módszerben bemutatott kísérleti feltételek mellett elvégezze az MTT-formazán mérését.

Elfogadhatósági kritériumok

35. Minden olyan vizsgálati módszer esetében, amelynek során érvényes RhE-modell tételeket alkalmaznak (lásd a 23. pontot), a negatív kontrollal kezelt szöveteknek olyan OD-értéket kell mutatniuk, amely tükrözi a szöveteknek a szállítást és az átvételi lépéseket, valamint az összes protokollfolyamatot követő minőségét. A kontrollok OD-értékei nem lehetnek alacsonyabbak a korábbi adatok alapján megállapított határértékeknél. Hasonlóképpen a pozitív kontrollanyaggal, vagyis nátrium-dodecil-szulfát (SDS) 5 %-os vizes oldatával kezelt szöveteknek tükrözniük kell azon képességüket, hogy a vizsgálati módszer feltételei mellett reagálnak az irritáló vegyi anyagokra (lásd a 3. függeléket, további információkért pedig az e vizsgálati iránymutatáshoz tartozó négy vizsgálati modell szabványműveleti eljárását (32) (33) (34) (35)). A szövetreplikátumok közötti, ezzel kapcsolatos megfelelő eltérés, vagyis a szórás mértékének az alkalmazott vizsgálati modellhez tartozó elfogadási határértéken belül kell maradnia (lásd a 3. függeléket).

Az eredmények értelmezése és az előrejelzési modell

36. Az egyes vizsgálati vegyi anyagokra vonatkozóan kapott OD-értékek felhasználhatók a negatív kontrollra normalizált életképesség százalékos arányának kiszámításához, amely 100 %-ra vonatkozik. HPLC/UPLC spektrofotometria alkalmazása esetén a szövetek életképességi aránya a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott MTT-formazán csúcsterület és a párhuzamos negatív kontrollal kapott MTT-formazán csúcsterület arányaként kerül meghatározásra. Az irritáló anyagokat a kategória nélküli vizsgálati vegyi anyagoktól megkülönböztető százalékos sejtéletképesség határértékét, valamint az eredmények értékeléséhez és az irritáló hatású vegyi anyagok meghatározásához alkalmazott statisztikai eljárás(oka)t egyértelműen meg kell határozni, dokumentálni kell, és megfelelőségüket igazolni kell (további információkért lásd a vizsgálati modellek szabványműveleti eljárását). Az irritáló hatás előrejelzésére alkalmazott határértékek az alábbiak:

▼M8

— A vizsgálati vegyi anyagot szükséges az ENSZ GHS/CLP-rendelet szerint osztályozni és címkézni (2. kategória vagy 1. kategória), ha a szövet expozíciót és kezelés utáni inkubációt követően meghatározott átlagos életképességi aránya kisebb vagy egyenlő (≤) 50 %-kal. Mivel az e vizsgálati módszer alá tartozó RhE vizsgálati modellek nem tudnak különbséget tenni az ENSZ GHS/CLP-rendelet szerinti 1. és 2. kategória között, a vizsgálati vegyi anyag végleges osztályba sorolásához a bőrkorróziós hatására vonatkozó további információkra van szükség [lásd még az OECD IATA-iránymutatását (3)]. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyagról (a B.40., B.40bis. vagy B.65. vizsgálati módszer alapján) kiderül, hogy nem korrozív hatású, továbbá az expozíciót és kezelés utáni inkubációt követően a kezelt szövet életképessége kisebb vagy egyenlő (≤) 50 %-kal, az ENSZ GHS/CLP-rendelet 2. kategóriája szerint az adott anyag bőrirritáló hatásúnak tekintendő.

— Ha az expozíciót és kezelés utáni inkubációt követően a kezelt szövet életképessége nagyobb (>) mint 50 %, a tagállami szabályozási kerettől függően a vizsgálati vegyi anyag az ENSZ GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli” besorolása szerint bőrirritációt nem okozónak tekinthető.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

37. Mindegyik vizsgálatmenetre vonatkozóan táblázatos jelentést kell készíteni az egyes szövetreplikátumok adatairól (például OD-értékek és számított százalékos sejt-életképességi adatok az egyes vizsgálati vegyi anyagok esetében, a besorolást is beleértve), amelyben szerepelnie kell a megismételt kísérletek adatainak is, ha voltak ilyenek. Továbbá mindegyik vizsgálatmenet esetében meg kell adni az átlagot ± szórást. Az MTT reagenssel és a színes vizsgálati vegyi anyagokkal megfigyelt kölcsönhatásokat a jelentésben minden vizsgálati vegyi anyag esetében fel kell tüntetni.

Vizsgálati jelentés

38. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag és kontrollként szolgáló vegyi anyagok:

— Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;

— több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek: amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai jellemzik;

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— eredet, gyártási szám, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag/kontrollként szolgáló vegyi anyagok vizsgálatot megelőző kezelése, ha történt ilyen (például melegítés, porítás);

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, felhasználási határideje vagy ismételt elemzésének napja, ha ismert;

— tárolási feltételek.

Az alkalmazott RhE-modell és protokoll (valamint használatuk indokolása, amennyiben szükséges)

▼**M8**

Vizsgálati körülmények:

— az alkalmazott RhE-modell (és gyártási szám);

— az MTT-formazán mennyiségi meghatározására használt mérőeszköz (*pl.* spektrofotométer) kalibrálási adatai, a hullámhossz és (adott esetben) a sávszélesség, valamint a mérőeszköz linearitási tartománya; az MTT-formazán számszerű mérésére alkalmazott módszer leírása;

— a HPLC/UPLC-spektrofotometriás rendszer minősítésének leírása, ha releváns; az alkalmazott specifikus RhE-modellre vonatkozó teljes körű alátámasztó adatok, köztük a modell teljesítménye. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia:

i. életképesség;

ii. barrierfunkció;

iii. morfológia;

iv. reprodukálhatóság és előre jelezhetőség;

v. a modell minőség-ellenőrzése;

— hivatkozás a modellel kapott korábbi adatokra. Ennek többek között magában kell foglalnia a minőség-ellenőrzési adatok elfogadhatóságát tekintettel a korábbi tételadatokra;

— a vizsgálati módszer végrehajtásában való jártasság bizonyítása a módszer rutinszerű használata előtt, a jártassági tesztanyagok vizsgálata révén.

Vizsgálati eljárás:

— az alkalmazott vizsgálati eljárás részletes leírása (ideértve az expozíciós időszak utáni öblítési eljárásokat); a vizsgálati vegyi anyag és a kontroll-anyagok dózisa;

— az expozíciós és az expozíció utáni inkubációs időszak hossza és az alkalmazott hőmérséklet;

— a közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező és/vagy színváltozást okozó vizsgálati vegyi anyagokhoz alkalmazott kontrollok feltüntetése, amennyiben releváns;

— vizsgálati vegyi anyagonként és kontrollonként (pozitív kontroll, negatív kontroll, NSMTT, $NSC_{élő}$ és NSC_{elhalt}, ha releváns) használt szövetreplikátumok;

— a használt RhE-modell alapján alkalmazott döntési kritériumok/előrejelzési modell leírása;

— a vizsgálati eljárás (többek között a mosási eljárások) bármilyen változtatásának leírása.

A vizsgálatmenet és a vizsgálat elfogadásának kritériumai:

— a pozitív és negatív kontrollok átlagértéke és elfogadhatósági tartománya a korábbi adatokon alapul; a pozitív és negatív kontrollokban használt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás;

▼M8

— a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás.

Eredmények:

— az egyes vizsgálati vegyi anyagokra, vizsgálatmenetekre és szövetmérésekre vonatkozó adatok, többek között az OD-érték vagy az MTT-formazán csúcsterület, a szövetek százalékos életképessége, a szövetek átlagos százalékos életképessége és a szórások táblázatba foglalása;

— amennyiben alkalmazandó, a közvetlen MTT-redukáló hatású és/vagy elszíneződést okozó vizsgálati vegyi anyagokhoz használt kontrollok eredményei, ideértve az OD-értéket vagy az MTT-formazán csúcsterületet, az NSMTT, az $NSC_{élő}$ és az NSC_{elhalt} arányát, a szórást és a szövetek helyes végső százalékos életképességét;

— a meghatározott vizsgálatmenet és a vizsgálat elfogadhatósági kritériumai tekintetében a vizsgálati vegyi anyaggal/anyagokkal és a kontrollanyagokkal kapott eredmények;

— a megfigyelt egyéb hatások leírása.

— az alkalmazott előrejelzési modellel/döntési kritériumokkal összhangban kialakított osztályozás.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Elérhető a következő címen: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. Elérhető a következő címen: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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(4) E melléklet B.4., Akut bőrirritáció/bőrkorrózió fejezete.

(5) E melléklet B.40., *In vitro* bőrkorrózió: transzkután elektromos rezisztencia (TER) vizsgálat című fejezete;

(6) E melléklet B.40bis., *In vitro* bőrkorrózió: rekonstruált emberi felhám-modellen végzett vizsgálati módszer című fejezet.

(7) E melléklet B.65., *In vitro* Membrán barrier vizsgálati módszer fejezete.

▼**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) Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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. Elérhető a következő címen: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. *Megjegyzés Ezek a két vizsgálati módszer validálásához használt, eredeti teljesítményszabványok. Ezek a teljesítményszabványok már használhatók, mert rendelkezésre áll frissített változatuk (8).*

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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. 2001. május. Elérhető a következő címen:[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). *Megjegyzés Ez az ECVAM teljesítményszabványainak aktuális változata, amelyet az ENSZ GHS végrehajtására való tekintettel 2009-ben frissítettek. Ezek a teljesítményszabványok már nem használhatók, mert rendelkezésre áll az e vizsgálati iránymutatáshoz kapcsolódó, frissített változatuk (8).*

(40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.

(41) EC (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 Adapting to Technical Progress for the 28th Time Council Directive 67/548/EEC on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions Relating to the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances, Official Journal of the European Union L225, 1-333.

▼M8

1. Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezés” megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (9).

Sejtek életképessége: A sejtpopulációk teljes aktivitását mérő paraméter (például a celluláris mitokondriális dehidrogenázoknak az MTT ([3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid, tiazolil kék] vitális festéket redukáló képessége), amely – a mért végponttól és az alkalmazott vizsgálati tervtől függően – korrelációt mutat az élő sejtek teljes számával és/vagy életképességével.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Egyezés: a kategorikus eredményt adó vizsgálati modellek teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. A kifejezést esetenként használják a pontosság megfelelőjeként, és úgy határozzák meg, mint a helyesen pozitívként vagy negatívként besorolt összes vizsgálati vegyi anyag aránya. Az egyezés nagy mértékben függ a vizsgálat tárgyát képező vizsgálati vegyi anyag típusaiban előforduló pozitív eredmények gyakoriságától (9).

ET_{50}: a referencia-vegyianyag meghatározott, állandó koncentrációban történő alkalmazása esetén a sejt életképességének 50 %-kal való csökkentéséhez szükséges expozíciós idő meghatározásával becsülhető meg, lásd még az IC_{50}-et.

GHS (a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az ENSZ által globálisan harmonizált rendszere): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

HPLC: nagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

IATA: integrált vizsgálati és értékelési megközelítés.

IC_{50}: annak a koncentrációnak a meghatározásával becsülhető meg, amelynél egy adott referencia-vegyianyag egy meghatározott expozíciós idő elteltével 50 %-kal (IC_{50}) csökkenti a szövetek életképességét; lásd még az ET_{50}-et.

Végtelen dózis: az epidermiszen alkalmazott vizsgálati vegyi anyag azon mennyisége, amely meghaladja az epidermisz felszínének teljes és egyenletes befedéséhez szükséges mennyiséget.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

▼M8

MTT: 3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid; tiazolil kék tetrazólium-bromid.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

NSC_{elhalt}: elhalt szöveteken megfigyelt, nem specifikus elszíneződés.

$NSC_{élő}$: élő szöveteken megfigyelt, nem specifikus elszíneződés.

NSMTT: nem specifikus MTT-redukció.

Teljesítményszabványok: hitelesített referenciamódszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és iii. a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, hasonló megbízhatósági és pontossági szintek, amelyeket a javasolt vizsgálati módszernek teljesítenie kell a minimális jegyzék referencia-vegyianyagainak felhasználásával történő értékelése során (9).

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó vegyi anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (9).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (9).

Helyettesítő vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek célja, hogy a veszélyek azonosítására és/vagy kockázatértékelésre rutinszerűen alkalmazott és elfogadott vizsgálatot helyettesítse, és amelyről megállapították, hogy az elfogadott vizsgálattal összehasonlítva, az összes lehetséges vizsgálati helyzetben és vegyi anyag esetében a humán vagy állati egészség egyenértékű vagy jobb védelmét biztosítja (9).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos negatív kontrollal és egy pozitív kontrollal.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vizsgálati vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (9).

▼M8

In vivo bőrirritáció: a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően 4 órán belül megjelenő, visszafordítható bőrkárosodás. A bőrirritáció az érintett bőrszöveg helyileg jelentkező reakció, amely röviddel a stimuláció után megjelenik (38). Kiváltó oka a bőrszövet természetes (nem specifikus) immunrendszerét érintő, helyi gyulladásos reakció. Fő jellemzője, hogy gyulladásos reakciókkal járó visszafordítható folyamat a gyulladásos folyamatokra jellemző legtöbb klinikai tünettel együtt (bőrpír, ödéma, viszketés és fájdalom).

Specificitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vizsgálati vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (9).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UPLC: ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, valamint komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

▼**M8**

2. Függelék

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ALÁ TARTOZÓ VIZSGÁLATI MODELLEK

Szám	A vizsgálati modell neve	Validálási vizsgálat típusa	Hivatkozások
1	EpiSkin™	Teljes körű prospektív validálási vizsgálat (2003–2007). E modell alkotóelemeit felhasználták arra, hogy meghatározzák a vizsgálati módszernek az ECVAM eredeti és frissített teljesítményszabványaiba felvett alapvető összetevőit (39) (40) (21) (*). Ezenfelül nagyrészt a módszer nem kategorizált és kategorizált anyagok megkülönböztetésével kapcsolatos adatai szolgáltatták az alapot az eredeti teljesítményszabvány specificitási és érzékenységi értékeinek meghatározásához (*).	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*eredeti*): Az 1. számú modellel együtt ez a modell is részt vett a 2003 és 2007 között végzett teljes körű előretekintő validálásban. E modell alkotóelemeit felhasználták arra, hogy meghatározzák a vizsgálati módszernek az ECVAM eredeti és frissített teljesítményszabványaiba felvett alapvető összetevőit (39) (40) (21) (*). **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** Az eredeti EpiDerm™ módosított változatát az ECVAM eredeti teljesítményszabványai (21) alapján validálták 2008-ban (*)	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Validálási vizsgálatát az ECVAM eredeti teljesítményszabványai (21) alapján végezték el 2008-ban (*)	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	A validálási vizsgálatot (2011–2012) az OECD 439. vizsgálati iránymutatásában (8) szereplő teljesítményszabványok szerint végezték el, amelyek az ECVAM frissített teljesítményszabványain (*) alapulnak (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) és e vizsgálati iránymutatás teljesítményszabványai (8) (*)

(*) Az ECVAM eredeti teljesítményszabványait (21) 2007-ben dolgozták ki. az előretekintő validálási vizsgálat (16) lezárását követően, amely az 1. és 2. számú vizsgálati modell teljesítményét értékelte az EU veszélyes anyagokról szóló irányelvének (41) 28. módosításában ismertetett osztályozási rendszer szerint. 2008-ban megjelent az ENSZ által készített GHS (1) és az EU CLP-rendelete, amelyek a nem kategorizált anyagokat a kategorizált anyagoktól megkülönböztető határértéket az *in vivo* 2,0-ás pontszámról 2,3-ra módosították. Annak érdekében, hogy az ECVAM teljesítményszabványait e megváltozott szabályozási követelményhez igazítsák, 2009-ben frissítették pontossági értékeit és a referencia-vegyianyagok jegyzékét (2) (39) (40). Az eredeti teljesítményszabványokhoz hasonlóan frissített változatuk is többnyire az 1. és 2. számú modell adataira támaszkodik (16), ugyanakkor kiegészítette azokat a 3. számú modell referencia-vegyianyagokra vonatkozó adataival. 2010-ben az ECVAM frissített teljesítményszabványait írták elő az e vizsgálati iránymutatás keretében használandó teljesítményszabványoknak (8). E vizsgálati módszer alkalmazásában az EpiSkin™ számít validált referenciamódszernek, mivel ezt a modellt használták a teljesítményszabványok összes kritériumának kidolgozásához. A validálási vizsgálatok részletes adatait, a vizsgálatok során nyert adatok gyűjteményét, valamint a teljesítményszabványok ENSZ GHS/CLP-rendelet elfogadásából fakadóan szükségessé vált módosításának hátterét az OECD megfelelő, 439. vizsgálati iránymutatásához mellékelt, ECVAM/BfR által kiadott magyarázó háttérdokumentum (23) tartalmazza.

SIT: Skin Irritation Test (bőrirritációs vizsgálat)

RHE: Reconstructed Human Epidermis (rekonstruált emberi felhám)

▼M8

3. Függelék

A VIZSGÁLATI MÓDSZERHEZ TARTOZÓ VIZSGÁLATI MODELLEKRE JELLEMZŐ PROTOKOLLPARAMÉTEREK

A rekonstruált emberi felhámmodellek protokollja sok hasonlóságot mutat, például az expozíció utáni inkubációs időszak hossza mindegyiknél 42 óra (32) (33) (34) (35). Az eltérések jórészt a vizsgálati modellek különböző barrierfunkcióihoz kapcsolódó három paraméternél jelentkeznek, ezek a paraméterek a következők: A) preinkubációs idő és a közeg mennyisége, B) a vizsgálati vegyi anyagok alkalmazása és C) a közeg posztinkubációs mennyisége.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Preinkubáció				
Inkubációs idő	18–24 óra	18–24 óra	< 2 óra	15-30 óra
Közeg mennyisége	2 ml	0,9 ml	0,3 vagy 1 ml	0,5 ml
B) A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása				
Folyadékok esetén	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Szilárd anyagok esetén	10 mg (26 mg/cm^2) + DV (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16mg (32 mg/cm^2) + DV (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + DV (25 µl)
Nejlonháló használata	Nem használt	Szükség esetén	Használt	Nem használt
Teljes alkalmazási idő	15 perc	60 perc	42 perc	15 perc
Alkalmazási hőmérséklet	Szobahőm.	a) Szobahőm. 25 percig b) 37 °C-on 35 percig	Szobahőm.	Szobahőm.
C) A közeg posztinkubációs mennyisége				
Közeg mennyisége	2 ml	0,9 ml × 2	2 ml	1 ml
D) Maximális elfogadható eltérés				
A szövetpéldányok közötti szórás	Szórás≤18	Szórás≤18	Szórás≤18	Szórás≤18

SzH: szobahőmérséklet
DV: desztillált víz
DPBS: Dulbecco-féle foszfátpuffert tartalmazó sóoldat

▼**M8**

4. Függelék

A REKONSTRUÁLT EMBERI FELHÁMSZÖVETBŐL KIVONT MTT-FORMAZÁN MÉRÉSÉRE HASZNÁLT HPLC/UPLC SPETROFOTOMETRIÁS RENDSZER MINŐSÍTÉSÉNEK FŐBB PARAMÉTEREI ÉS ELFOGADHATÓSÁGI KRITÉRIUMAI

Paraméter	Az FDA-iránymutatás szerinti protokoll (36) (37)	Elfogadhatósági kritériumok
Szelektivitás	Izopropanol elemzése, élő vakpróba (nem kezelt élő RhE-szövetekből kivont izopropanol), elhalt vakpróba (nem kezelt elhalt RhE-szövetekből kivont izopropanol)	$Terület_{interferencia} \leq Terület_{AMHÉ}$ ([1]) 20 %-a
Precizitás	Minőség-ellenőrzések (vagyis MTT-formazán 1,6 μg/ml, 16 μg/ml és 160 μg/ml mellett) izopropanolban (n=5)	Variációs koefficiens ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a
Pontosság	Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Eltérési arány ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a
Mátrixhatás	Minőség-ellenőrzés élő vakpróbán (n=5)	85 % ≤ Mátrixhatás % ≤ 115 %
Átvitel	Izopropanol elemzése egy FMHÉ ([2]) szabvány után	$Terület_{interferencia} \leq Terület_{AMHÉ}$ 20 %-a
Megismételhetőség (napon belüli)	3 független kalibrációs görbe (izopropanolba helyezett MTT-formazán 6 egymás utáni 1/3-os hígítása kezdve a FMHÉ-nél, vagyis 200 μg/ml-nél); Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Kalibrációs görbék: Eltérési arány ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a Minőség-ellenőrzések: Eltérési arány ≤ 15 % és variációs koefficiens ≤ 15 %
Megismételhetőség (napok közötti)	1. nap:: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 2. nap:: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 3. nap:: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3)	
Az MTT-formazán rövid távú stabilitása az RhE szövetkivonatban	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és 24 órás szobahőmérsékleten való tárolás után	Eltérési arány ≤ 15 %
Az MTT-formazán hosszú távú stabilitása az RhE szövetkivonatban, ha szükséges	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és több napi, meghatározott hőmérsékleten (pl. 4 °C, -20 °C, -80 °C) történő tárolás után	Eltérési arány ≤ 15 %

([1]) AMHÉ: Alsó meghatározási határérték, amely 1–2 %-os szöveti életképességet takar, vagyis 0,8 μg/ml.
([2]) FMHÉ: Felső meghatározási határérték, amely legalább kétszer akkora mint a negatív kontroll izopropanolban várható legmagasabb MTT-formazán koncentrációja, vagyis 200 μg/ml.

▼M7

B.47. A SZARVASMARHA-SZARUHÁRTYA OPACITÁSÁNAK ÉS PERMEABILITÁSÁNAK MÉRÉSÉN ALAPULÓ VIZSGÁLATI MÓDSZER I. A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁST OKOZÓ VEGYI ANYAGOK ÉS II. A SZEMIRRITÁCIÓ VAGY A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁS TEKINTETÉBEN BESOROLÁST NEM IGÉNYLŐ VEGYI ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA

BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 437. vizsgálati iránymutatásában (2013) leírt módszerrel. A szarvasmarha-szaruhártya opacitásának és permeabilitásának mérésén alapuló vizsgálati módszert (a továbbiakban: BCOP vizsgálati módszer) az alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottság (ICCVAM) az Alternatív Módszerek Validálásával Foglalkozó Európai Központtal (ECVAM) és az Alternatív Módszerek Validálásával Foglalkozó Japán Központtal (JaCVAM) együtt értékelte 2006-ban és 2010-ben (1) (2). Az első értékelés során abból a szempontból értékelték a BCOP vizsgálati módszert, hogy mennyire hasznos a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok (anyagok és keverékek) (1) azonosításához. A második értékelés során abból a szempontból értékelték a BCOP vizsgálati módszert, hogy mennyire hasznos a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében nem besorolt vegyi anyagok (anyagok és keverékek) (2) azonosításához. A BCOP validációs adatbázis összesen 113 anyagot és 100 keveréket tartalmazott (2) (3). Ezen értékelések és szakmai vizsgálatuk alapján megállapítást nyert, hogy a vizsgálati módszer helyesen tudja azonosítani a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által globálisan harmonizált rendszerének (GHS) (4), illetve az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletnek ([1]) (CLP-rendelet) a meghatározása szerint súlyos szemkárosodást okozó (1. kategóriába tartozó) vegyi anyagokat (anyagokat és keverékeket egyaránt), továbbá szemirritáció vagy súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagokat, ezért azt tudományosan megalapozottként elfogadták mindkét célra. Súlyos szemkárosodás a vizsgálati vegyi anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül nem teljes mértékben visszafordítható szövetkárosodás a szemben, vagy a látóképesség súlyos fizikai romlása. A súlyos szemkárosodást okozó vizsgálati vegyi anyagok az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába sorolandók be. A szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében be nem sorolt vegyi anyagok olyan vegyi anyagok, amelyek nem tesznek eleget az ENSZ-GHS szerinti 1. vagy 2. (2A. vagy 2B.) kategóriába való besorolás követelményeinek, vagyis azokra az ENSZ-GHS szerint kategória nélküliként történik hivatkozás. Ez a vizsgálati módszer a BCOP vizsgálati módszer ajánlott alkalmazását és korlátait tartalmazza a módszer értékelései alapján. Az OECD vizsgálati iránymutatásának eredeti, 2009-es változata és frissített, 2013-as változata közötti legfőbb eltérések többek között, de nem kizárólag a következők: a BCOP vizsgálati módszer ENSZ-GHS szerint besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására történő alkalmazása (2. és 7. pont); a BCOP vizsgálati módszer alkoholok, ketonok és szilárd anyagok vizsgálatára (6. és 7. pont), valamint anyagok és keverékek vizsgálatára (8. pont) való alkalmazhatóságával kapcsolatos pontosítások; a felületaktív anyagok és a felületaktív anyagokat tartalmazó keverékek vizsgálatának módjával kapcsolatos pontosítások (28. pont); a pozitív kontrollokra vonatkozó frissítések és pontosítások (39. és 40. pont); a BCOP vizsgálati módszerrel kapcsolatos döntés kritériumainak frissítése (47. pont); a vizsgálat elfogadhatósági kritériumainak frissítése (48. pont); a Vizsgálati jegyzőkönyv elemeinek frissítése (49. pont); a fogalommeghatározásokat tartalmazó 1. függelék frissítése; a 2. függelék beillesztése a BCOP vizsgálati módszer különféle osztályozási rendszerek szerinti prediktív értéke tekintetében; a jártassági tesztanyagok jegyzékét tartalmazó 3. függelék frissítése, valamint a BCOP vizsgálathoz alkalmazott szaruhártyatartóról (1. pont) és az opaciméterről (2. és 3. pont) szóló 4. függelék frissítése.

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 2008. december 16-i 1272/2008/EK rendelete az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353., 2008.12.31., 1. o.).

▼M7

Jelenleg általánosan elfogadott, hogy az előre látható jövőben egyetlen *in vitro* szemirritációs vizsgálat sem tudja majd helyettesíteni a Draize-féle *in vivo* szemvizsgálatot a különböző kémiai osztályoknál felmerülő irritáció teljes skálájának előrejelzésére. Előfordulhat azonban, hogy egy-egy (többszintű) vizsgálati stratégián belüli több alternatív vizsgálati módszer stratégiai kombinációja helyettesíteni tudja a Draize-féle szemvizsgálatot (5). A felülről építkező megközelítés (5) akkor alkalmazandó, ha a meglévő információk alapján valamely vegyi anyag várhatóan rendkívül irritáló hatású lehet, míg az alulról építkező megközelítés (5) akkor alkalmazandó, ha a meglévő információk alapján valamely vegyi anyag várhatóan nem okoz a besorolás szükségességéhez elegendő szemirritációt. A BCOP vizsgálati módszer bizonyos körülmények között és meghatározott korlátokkal a vegyi anyagok szemet érintő veszélyességükre tekintettel történő osztályozására és címkézésére alkalmazható *in vitro* vizsgálati módszer. Bár a BCOP vizsgálati módszer nem minősül a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatot önállóan helyettesítő vizsgálati módszernek, első lépésként ajánlott a Scott és társai (5) által javasolt felülről építkező megközelítéshez hasonló vizsgálati stratégia keretében a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok, azaz a további vizsgálat nélkül az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába sorolandó vegyi anyagok (4) azonosítására. A BCOP vizsgálati módszer ajánlott az ENSZ-GHS-ben meghatározott, a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS szerinti kategória nélküli) vegyi anyagok (4) olyan vizsgálati stratégia keretében történő azonosítására, mint az alulról építkező megközelítés (5). Azonban az a vegyi anyag, amely a BCOP vizsgálati módszerrel előreláthatólag nem okoz súlyos szemkárosodást vagy nem tartozik a szemirritáció/súlyos szemkárosodás tekintetében nem besorolt anyagok közé, további (*in vitro* és/vagy *in vivo*) vizsgálatot tenne szükségessé a végleges osztály megállapításához.

E vizsgálati módszer célja a vizsgálati vegyi anyag szemet érintő veszélyességi potenciáljának értékelésére használt eljárások ismertetése annak alapján, hogy az anyag izolált szarvasmarha-szaruhártyában kivált-e opacitást és fokozott permeabilitást. A szaruhártyára gyakorolt toxikus hatások jellemzése i. a csökkent fényátbocsátás (opacitás) és ii. a fluoreszcein-nátrium festékanyag fokozott áthatolása (permeabilitás) mérésével történik. A szaruhártya vizsgálati vegyi anyagnak való expozícióját követően megállapítható opacitásból és permeabilitásból együttesen kell származtatni az ún. *in vitro* irritációs pontszámot (*In Vitro* Irritancy Score, a továbbiakban: IVIS), amely a vizsgálati vegyi anyag irritáció szempontjából való osztályba sorolására szolgál.

A fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

Ez a vizsgálati módszer az ICCVAM BCOP vizsgálati módszerről szóló protokollján (6) (7) alapul, amelynek kidolgozása eredetileg az Institute for *in vitro* Sciences (*In Vitro* Tudományok Intézete; IIVS) protokolljából és a 124. INVITTOX-protokollból (8) származó információk alapján történt. Ez utóbbi az Európai Közösség által támogatott, 1997–1998-ban végzett elővalidációs vizsgálathoz használt protokoll. Mindkét protokoll alapja az a BCOP vizsgálati módszer volt, amelyről elsőként Gautheron és társai (9) számoltak be.

A BCOP vizsgálati módszer alkalmazható az ENSZ-GHS-ben meghatározott, súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok, azaz az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába (4) sorolandó vegyi anyagok azonosítására. Erre a célra történő alkalmazásakor a BCOP vizsgálati módszer általános pontossága 79 % (150/191), hamis pozitív aránya 25 % (32/126), hamis negatív aránya pedig 14 % (9/65) a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálati módszer ENSZ-GHS osztályozási rendszer szerint besorolt adataival való összevetéskor (3) (lásd a 2. függelék 1. táblázatát). Amikor bizonyos kémiai osztályokba (például alkoholok, ketonok) vagy fizikai osztályokba (például szilárd anyagok) tartozó vizsgálati vegyi anyagok nem szerepelnek az adatbázisban, a BCOP vizsgálati módszer általános pontossága 85 % (111/131), hamis pozitív aránya 20 % (16/81), hamis negatív aránya

▼M7

pedig 8 % (4/50) az ENSZ-GHS osztályozási rendszer vonatkozásában (3). A BCOP vizsgálati módszernek a súlyos szemkárosodást okozó (az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába sorolt) vegyi anyagok azonosítására történő alkalmazásakor felmerülő hiányosságai a validációs adatbázisban az alkoholok és a ketonok esetében tapasztalt magas hamis pozitív arányokon és a szilárd anyagok esetében tapasztalt magas hamis negatív arányon alapulnak (1) (2) (3). Mivel azonban a BCOP vizsgálati módszerrel nem minden alkohol és keton előrejelzése túlzó, és a módszer egyes alkoholokat és ketonokat helyesen jelez előre az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába tartozóként, ez a két szerves funkciós csoport nem tekintendő a vizsgálati módszer alkalmazási területén kívül esőnek. A vizsgálati módszer alkalmazójának kell eldöntenie azt, hogy valamely alkohol vagy keton túlzó előrejelzése elfogadható-e, illetve azt, hogy kell-e további vizsgálatot végezni az adatok bizonyító erejének mérlegelésén alapuló megközelítés keretében. A szilárd anyagok esetében tapasztalt hamis negatív arányok tekintetében megjegyzendő, hogy változó és szélsőséges expozíciós körülményekhez vezethetnek a Draize-féle *in vivo* szemirritációs vizsgálat során, ami a tényleges irritációs hatásukra (10) vonatkozó irreleváns előrejelzéseket eredményezhet. Megjegyzendő az is, hogy a súlyos szemkárosodást okozó (az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába tartozó) vegyi anyagok azonosításával összefüggésben az ICCVAM validációs adatbázisában (2) (3) meghatározott hamis negatív arányok következtében az IVIS értéke egyik esetben sem lett ≤ 3, amely érték az ENSZ-GHS szerint a nem besorolt vegyi anyagok azonosítására használt kritérium. Ezen túlmenően a BCOP szerinti hamis negatív arányok ebben az összefüggésben nem kritikus jelentőségűek, mivel minden 3-nál nagyobb, de legfeljebb 55 IVIS értékű vizsgálati vegyi anyag vizsgálatára sor kerülne más, megfelelően validált *in vitro* vizsgálatokkal, vagy – a szabályozási követelményektől függően, az adatok bizonyító erejének mérlegelésén alapuló megközelítés keretébe tartozó lépcsőzetes vizsgálati stratégia segítségével – utolsó lehetőségként nyulakon végzett vizsgálatokkal. Mivel a BCOP vizsgálati módszer egyes szilárd vegyi anyagokat helyesen jelez előre az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába tartozóként, ez a halmazállapot szintén nem minősül a vizsgálati módszer alkalmazási területén kívül esőnek. A vizsgálók valamennyi típusú vegyi anyag esetében mérlegelhetik e vizsgálati módszer alkalmazását, amellyel 55-nél magasabb IVIS értéket további vizsgálat nélkül az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába sorolandó súlyos szemkárosodást okozó reakcióra utaló jelként kell elfogadni. Ahogyan azonban már említésre került, az alkoholok és a ketonok esetében a kapott pozitív eredményeket az esetlegesen túlzó előrejelzés kockázata miatt óvatosan kell értelmezni.

A BCOP vizsgálati módszer az ENSZ-GHS osztályozási rendszer (4) szerint a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására is alkalmazható. Erre a célra történő alkalmazásakor a BCOP vizsgálati módszer általános pontossága 69 % (135/196) hamis pozitív aránya 69 % (61/89), hamis negatív aránya pedig 0 % (0/107) a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálati módszer ENSZ-GHS osztályozási rendszer szerint besorolt adataival való összevetéskor (3) (lásd a 2. függelék 2. táblázatát). A kapott hamis pozitív arány (a 3-nál magasabb IVIS értéket mutató, az ENSZ-GHS szerint kategória nélküli vegyi anyagok *in vivo* vizsgálata, lásd a 47. pontot) rendkívül magas, de ebben az összefüggésben nem kritikus jelentőségű, mivel a minden 3-nál nagyobb, de legfeljebb 55 IVIS értékű vegyi anyagot ezután más, megfelelően validált *in vitro* vizsgálatoknak vetnek alá, vagy utolsó lehetőségként – a szabályozási követelményektől függően, az adatok bizonyító erejének mérlegelésén alapuló megközelítés keretébe tartozó lépcsőzetes vizsgálati stratégia segítségével – nyulakon is megvizsgálják. A BCOP vizsgálati módszer nem mutat hiányosságokat az alkoholok, a ketonok és a szilárd anyagok vizsgálata tekintetében, amikor a cél a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS szerint kategória nélküli) vegyi anyagok azonosítása (3). A vizsgálók valamennyi típusú vegyi anyag esetében mérlegelhetik e vizsgálati módszer alkalmazását, amellyel a negatív eredményt (IVIS ≤ 3) arra utaló jelzésként kell elfogadni, hogy besorolás nem szükséges (az ENSZ-GHS szerint kategória nélküli). Mivel a BCOP vizsgálati módszer a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagoknak csak a 31 %-át tudja helyesen azonosítani, nem lehet első választási lehetőség az alulról építkező megközelítés (5) megkezdéséhez, ha rendelkezésre állnak más validált és elfogadott, hasonló érzékenységű, de specifikusabb *in vitro* módszerek.

▼M7

A BCOP validációs adatbázis összesen 113 anyagot és 100 keveréket tartalmazott (2) (3). A BCOP vizsgálati módszer ezért az anyagok és a keverékek vizsgálatára egyaránt alkalmazhatónak tekintendő.

Az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába tartozó, az ENSZ-GHS szerinti 2., 2A. vagy 2B. kategóriába alulosztályozott vegyi anyagok, valamint az ENSZ-GHS szerinti nem besorolt kategóriába tartozó, az ENSZ-GHS szerinti 2., 2A. vagy 2B. kategóriába felülosztályozott vegyi anyagok jelentős száma miatt a BCOP vizsgálati módszer nem ajánlott olyan vizsgálati vegyi anyagok azonosítására, amelyeket szemirritáló hatásúként (azaz az ENSZ-GHS szerinti 2. vagy 2A. kategóriába tartozóként) kell besorolni, illetve olyan vizsgálati vegyi anyagok azonosítására, amelyeket enyhén szemirritáló hatásúként (az ENSZ-GHS szerinti 2B. kategóriába tartozóként) kell besorolni (2) (3). E célból egy másik megfelelő módszerrel végzett további vizsgálatra lehet szükség.

A szarvasmarhaszemmel és a szarvasmarha-szaruhártyával végzett valamennyi eljárás során be kell tartani a vizsgáló intézménynek az állati eredetű anyagok – ideértve többek között, de nem kizárólag a szöveteket és a szöveti folyadékokat – kezelésére vonatkozó rendelkezéseit és eljárásait. Ajánlott továbbá követni az általános laboratóriumi óvintézkedéseket is (11).

Bár a BCOP vizsgálati módszer nem veszi figyelembe a kötőhártya- és az írisszérüléseket, foglalkozik a szaruhártyára kifejtett hatásokkal, amelyek leginkább befolyásolják az *in vivo* besorolást az ENSZ-GHS osztályozás alkalmazásában. Önmagában a BCOP vizsgálati módszerrel nem értékelhető a szaruhártya-léziók visszafordíthatósága. Nyulakon végzett szemvizsgálatok alapján korábban azt javasolták, hogy a szaruhártya-sérülés kezdeti mélységének értékelése alkalmazható a visszafordíthatatlan hatások bizonyos típusainak azonosítására (12). További tudományos ismeretekre van azonban szükség annak megértéséhez, hogy a kezdeti nagyon súlyos sérüléssel össze nem függő visszafordíthatatlan hatások hogyan következnek be. Végezetül a BCOP vizsgálati módszer nem alkalmas a szembe kerülés következtében fellépő szisztémás toxicitási potenciál megítélésére.

Ez a vizsgálati módszer rendszeres időközönkénti frissítés tárgyát fogja képezni az új információk és adatok figyelembevételekor. Például kórszövettani vizsgálatok esetlegesen hasznosak lehetnek, ha a szaruhártya-károsodás teljesebb körű jellemzésére van szükség. Ahogyan a 160. OECD-iránymutatásban (13) vázlatosan szerepel, a felhasználóknak érdemes tartósítaniuk a szaruhártyákat és azokból kórszövettani mintákat preparálniuk, amelyek felhasználhatóak a vizsgálati módszer pontosságát esetlegesen tovább javító adatbázis fejlesztéséhez és döntési kritériumok kidolgozásához.

Minden olyan laboratóriumnak, amely először alkalmazza ezt a vizsgálati módszert, a 3. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagokat kell használnia. Mielőtt a laboratórium a BCOP vizsgálati módszer adatait a szabályozási követelmények szerinti veszélyességi osztályozás céljaira rendelkezésre bocsátaná, e vegyi anyagok vizsgálatával demonstrálhatja a BCOP vizsgálati módszer végrehajtásában való szakmai jártasságát.

A VIZSGÁLAT ELVE

A BCOP vizsgálati módszer olyan organotipikus módszer, amely rövid távon *in vitro* fenntartja a szarvasmarhák izolált szaruhártyájának normál fiziológiai és biokémiai működését. E vizsgálati módszerrel a vizsgálati vegyi anyag által okozott károsodás értékelése a szaruhártya opacitásváltozásának opaciméterrel, illetőleg permeabilitásváltozásának látható fényes spektrofotométerrel való kvantitatív mérése útján történik. Mindkét mérés az IVIS értékének kiszámítására használatos, amely a vizsgálati vegyi anyag *in vivo* szemirritációs potenciáljának előrejelzését megalapozó *in vitro* irritációs veszélyességi osztályozási kategória megállapítására szolgál (lásd a 48. pontban található döntési kritériumokat).

A BCOP vizsgálati módszer frissen levágott szarvasmarhából izolált szaruhártyákat használ fel. A szaruhártya opacitásának mérése kvantitatív módon, a szaruhártyán átbocsátott fény mennyiségének mérésével történik. A permeabilitás mérése ugyancsak kvantitatív módon, a szaruhártya teljes vastagságán áthatoló és a hátsó kamrában található közegben kimutatható fluoreszcein-nátrium festékanyag mennyiségének mérésével történik. A vizsgálati vegyi anyagoknak a szaruhártya felhámjának felületére történő felvitele a szaruhártyatartó elülső kamrájába

▼M7

történő bevitellel történik. A 4. függelék tartalmazza a BCOP vizsgálati módszer során felhasznált szaruhártyatartó leírását és ábráját. A szaruhártyatartó a kereskedelmi forgalomban különféle forrásokból beszerezhető, vagy saját használatra megépíthető.

A szarvasmarhaszemek származása és életkora, valamint az állatfaj kiválasztása

A vágóhídon a szarvasmarhákat jellemzően emberi fogyasztás céljából vagy más kereskedelmi felhasználás céljából ölik le. A BCOP vizsgálati módszer keretében felhasználandó szaruhártyák csak az emberi élelmiszerláncba való bekerülésre alkalmasnak minősülő, egészséges állatokból vehetők. Mivel a szarvasmarhák tömege fajtától, életkortól és nemtől függően jelentős mértékben eltérhet, a vágásra kerülő állatok tekintetében nincs ajánlott tömeg.

Különböző életkorú állatokból származó szemek esetén a szaruhártya mérete változó lehet. A 30,5 mm vízszintes átmérőt meghaladó és legalább 1 100 μm középponti vastagságú szaruhártyák általában nyolcévesnél idősebb, a 28,5 mm átmérő és 900 μm középponti vastagság alatti szaruhártyák általában ötévesnél fiatalabb szarvasmarhából származnak (14). Emiatt nem szokás 60 hónaposnál idősebb szarvasmarhákból származó szaruhártyákat felhasználni. Hagyományosan nem szokás 12 hónaposnál fiatalabb szarvasmarhákból származó szemeket sem felhasználni, mivel ebben az életkorban a szemek még fejlődésben vannak, és a szaruhártya vastagsága és átmérője lényegesen kisebb a kifejlett szarvasmarhából származó szaruhártyákon mért értékeknél. Előnyeikre való tekintettel ugyanakkor megengedhető a fiatal (6 és 12 hónap közötti életkorú) állatokból származó szaruhártyák használata is, mivel ezek nagyobb mennyiségben állnak rendelkezésre, szűkebb az életkori tartományuk, és ez esetben kisebb a személyzet szarvasmarhák szivacsos agyvelőbántalmával szembeni esetleges kitettsége is (15). Mivel a szaruhártya méretének vagy vastagságának a korróziót és az irritációt okozó vegyi anyagokkal szembeni reagálási képességre gyakorolt hatásával kapcsolatban hasznos lenne további értékelést végezni, a felhasználóknak célszerű beszámolniuk az egyes vizsgálatokban felhasznált szaruhártyákat adó állatok becsült életkoráról és/vagy tömegéről.

A szemek begyűjtése és beszállítása a laboratóriumba

A szemeket a vágóhíd alkalmazottai gyűjtik be. A mechanikai és egyéb károsodásnak a lehető legkisebb mértékűre való csökkentése érdekében a szemeket a halál bekövetkezése után mihamarabb el kell távolítani, és az eltávolítás után azonnal, illetve szállítás közben le kell hűteni. A szemek potenciálisan irritatív vegyi anyagokkal szembeni expozíciójának megelőzése érdekében a vágóhíd alkalmazottai az állat fejének leöblítésekor nem használhatnak mosószert.

A szemeket megfelelő méretű edénybe öntött, hűtött, Hank-féle kiegyenlített sóoldatba (HBBS-oldat) kell helyezni oly módon, hogy az oldat a szemeket teljesen ellepje, és azokat a laboratóriumba oly módon kell beszállítani, hogy a lehető legkisebb legyen a károsodás és/vagy a bakteriális fertőzés esélye. Mivel a szemek begyűjtése a vágás során történik, azok vérrel és más biológiai anyagokkal – többek között baktériumokkal és más mikroorganizmusokkal – érintkezhetnek. Ezért fontos annak biztosítása, hogy a kontamináció veszélye a lehető legkisebb legyen (például a szemeket tartalmazó edény nedves jégen tárolásával a begyűjtés és a szállítás során, a szemek szállítás közbeni tárolására használt HBSS-oldathoz antibiotikumok [például 100 IU/ml koncentrációban penicillin és 100 mg/ml koncentrációban sztreptomicin] hozzáadásával).

A szemek begyűjtése és a szaruhártyák BCOP vizsgálati módszer közbeni felhasználása között eltelt időnek a lehető legrövidebbnek kell lennie (a begyűjtésnek és a felhasználásnak jellemzően ugyanazon a napon meg kell történnie), és igazolni kell, hogy ez az idő nem befolyásolja a vizsgálat eredményeit. Ezek az eredmények a szemek kiválasztási kritériumain, valamint a pozitív és a negatív kontrollok reakcióin alapulnak. A vizsgálatban felhasznált valamennyi szemnek egy meghatározott napon begyűjtött szemállományból kell származnia.

A BCOP vizsgálati módszer során felhasznált szemek kiválasztási kritériumai

A szemek épségét a laboratóriumba való beérkezést követően gondosan meg kell vizsgálni a sérülések – többek között a fokozott opacitás, a karcolások és a rendellenes érburjánzás (neovaszkularizáció) – szempontjából. A vizsgálat céljára csak ép szemekből származó szaruhártyák használhatók fel.

▼M7

Az egyes szaruhártyák minőségét a vizsgálat során később is kell értékelni. Azokat a szaruhártyákat, amelyek opacitása a kezdeti egyórás kiegyenlítődési időszak elteltével hét opacitásegységnél nagyobb vagy opaciméterrel azzal egyenértékű, valamint a felhasznált szaruhártyatartókat ki kell dobni (*MEGJEGYZÉS:* az opacimétert az opacitási egységek meghatározásához használt opacitás-etalonnal kell kalibrálni, lásd a 4. függeléket).

Minden kezelt csoportnak (a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt csoportnak, a párhuzamos negatív és pozitív kontrolloknak) legalább három szemből kell állnia. A BCOP vizsgálati módszer során a negatív kontroll céljára három szaruhártyát kell felhasználni. Mivel minden szaruhártya a teljes szemgolyóból kivágással kerül eltávolításra, majd pedig rögzítésre kerül a szaruhártyakamrában, előfordulhat, hogy a kezelés mesterségesen befolyásolja az egyes szaruhártyák (a negatív kontrollt is ideértve) opacitás- és permeabilitásértékét. Ezenfelül, az IVIS számítása során a negatív kontrollal kezelt szaruhártyák opacitás- és permeabilitásértékeinek felhasználásával korrigálják a vizsgálati vegyi anyaggal és a pozitív kontrollal kezelt szaruhártyák opacitás- és permeabilitásértékeit.

ELJÁRÁS

A szemek előkészítése

Az ép szaruhártyákat a későbbi kezelés elősegítése érdekében oly módon kell preparálni, hogy az ínhártyából 2–3 mm-es perem maradjon, ügyelve arra, hogy a szaruhártya fel- és belhámja ne sérüljön. Az izolált szaruhártyákat fel kell erősíteni a külön erre a célra kialakított, a szaruhártya felhámjával érintkező elülső, illetve belhámjával érintkező hátsó kamrából álló szaruhártyatartókra. Mindkét kamrát (a hátsó kamrával kezdve) teljesen fel kell tölteni előmelegített, fenolvörösmentes Eagle-féle tápfolyadékkal (Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM), ügyelve a buborékképződés megelőzésére. A berendezést ezt követően 32 ± 1 °C-on legalább egy órán át ekvilibrálni kell annak érdekében, hogy a szaruhártyák a közeggel kiegyenlítődjenek, és lehetőség szerint elérjék normális metabolikus aktivitásukat (a szaruhártya felületének hőmérséklete *in vivo* kb. 32 °C).

A kiegyenlítődési időszak eltelte után mindét kamrát friss, előmelegített, fenolvörösmentes Eagle-féle tápfolyadékkal fel kell tölteni, és minden egyes szaruhártyán le kell olvasni a kiindulási opacitásértéket. A makroszkopikus szöveti károsodást (például karcolásokat, elszíneződést, rendellenes érburjánzást) mutató, illetve a hétnél nagyobb vagy opaciméterrel azzal egyenértékű opacitású szaruhártyákat és a felhasznált szaruhártyatartókat el kell dobni. Legalább három szaruhártyát kell kiválasztani negatív (vagy oldószeres) kontrollként szolgáló szaruhártyaként. A megmaradó szaruhártyákat ezt követően kezelt csoportra és pozitív kontrollcsoportra kell osztani.

Mivel a víz fajhője nagyobb, mint a levegőé, a víz stabilabb hőmérsékleti viszonyokat biztosít az inkubáláshoz. Ezért a szaruhártyatartó és tartalmának 32 ± 1 °C hőmérsékleten való tartására vízfürdő használata ajánlott. A hőmérséklet állandóságának biztosítását szolgáló óvintézkedések (például a tartók és a közeg előmelegítése) mellett azonban használható levegős inkubátor is.

A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása

Két eltérő kezelési protokoll használatos, az egyik a folyadékok és a szilárd és folyékony felületaktív anyagok, a másik pedig a nem felületaktív szilárd anyagok esetében.

A folyadékok vizsgálata hígítatlan állapotban történik. A félszilárd anyagok, krémek és gyanták vizsgálata rendszerint a folyadékokra vonatkozó protokoll szerint történik. A felületaktív anyagok vizsgálata 10 vegyesszázalék (m/V) koncentrációban, 0,9 %-os nátrium-klorid oldattal, desztillált vízzel vagy más olyan oldószerrel készített oldatban történik, amely igazoltan nem gyakorol káros hatást a vizsgálati rendszerre. Ha a hígítás koncentrációja ettől eltérő, akkor azt megfelelően meg kell indokolni. A felületaktív anyagokat tartalmazó

▼M7

keverékek hígítatlan állapotban vagy megfelelő koncentrációjúra hígított állapotban vizsgálhatók, a megfelelő *in vivo* expozíciós forgatókönyvtől függően. A vizsgált koncentrációt megfelelően meg kell indokolni. A szaruhártyákat a folyadéknak vagy felületaktív anyagnak 10 percig kell kitenni. Ettől eltérő expozíciós idő alkalmazását tudományos szempontból megfelelően meg kell indokolni. A felületaktív anyag és a felületaktív anyagot tartalmazó keverék fogalommeghatározását lásd az 1. függelékben.

A nem felületaktív szilárd anyagok jellemző vizsgálata 20 vegyesszázalék (m/V) koncentrációban, 0,9 %-os nátrium-klorid-oldattal, desztillált vízzel vagy más olyan oldószerrel készült oldat vagy szuszpenzió formájában történik, amely igazoltan nem gyakorol káros hatást a vizsgálati rendszerre. A szilárd anyagok bizonyos körülmények között és megfelelő tudományos indokolással hígítatlanul, a szaruhártya felületére a nyitott kamrás módszerrel (lásd a 32. pontot) való közvetlen felvitellel is vizsgálhatók. A szaruhártyát a szilárd anyagnak négy órán át kell kitenni, de a folyadékok és a felületaktív anyagok esetéhez hasonlóan – tudományos szempontú megfelelő indokolással – más expozíciós idő is alkalmazható.

A vizsgálati vegyi anyag fizikai jellegétől és kémiai tulajdonságaitól (például szilárd anyag vagy folyadék, viszkózus vagy nem viszkózus folyadék) függően más felviteli módok is alkalmazhatók. A legfontosabb annak biztosítása, hogy a vizsgálati vegyi anyag megfelelően beborítsa a felhám felületét, valamint az, hogy az öblítési lépések során megfelelően eltávolítsák. A nem és a kissé viszkózus, folyékony vizsgálati vegyi anyagok esetében jellemzően a zárt kamrás, míg a közepes és a nagy viszkozitású folyékony vizsgálati vegyi anyagok, illetve a tiszta szilárd anyagok esetében jellemzően a nyitott kamrás módszer használatos.

A zárt kamrás módszer esetében az elülső kamrába a szaruhártya felhámjának befedéséhez elegendő mennyiségű (750 µl) vizsgálati vegyi anyagot kell a kamra tetején található adagolónyílásokon keresztül bevinni, majd az expozíció idejére a nyílásokat a kamradugaszokkal le kell zárni. Fontos annak biztosítása, hogy valamennyi szaruhártya megfelelő időközig legyen kitéve a vizsgálati vegyi anyagnak.

A nyitott kamrás módszer esetében a kezelés előtt el kell távolítani az elülső kamra ablakzáró gyűrűjét és az ablaknyílás üvegét. A kontrollként szolgáló vagy a vizsgálati vegyi anyagot (750 µl vagy a szaruhártya teljes befedéséhez elegendő mennyiségben) mikropipettával közvetlenül a szaruhártya felhámjának felületére kell felvinni. Ha a vizsgálati vegyi anyagot nehezen lehet pipettába felszívni, az az adagolás elősegítése érdekében finnpipettába pumpálható. A finnpipetta hegyét bele kell helyezni a fecskendő adagolójába, hogy az anyagot nyomás alatt lehessen betölteni a hegybe. A fecskendő dugattyúját a pipetta szelepének felfelé húzásával egyidejűleg be kell nyomni. Ha a pipetta hegyében légbuborékok jelennek meg, a vizsgálati vegyi anyagot el kell távolítani (ki kell nyomni) és a műveletet mindaddig ismételni kell, amíg a pipetta hegye légbuborékok nélkül feltelik. Szükség esetén normál fecskendő is használható (tű nélkül), mivel lehetővé teszi a vizsgálati vegyi anyag mennyiségének pontos mérését és a szaruhártya felhámjának felületére való könnyebb felvitelét. Az adagolást követően a zárt rendszer visszaállítása érdekében az ablaknyílás üvegét vissza kell szerelni az elülső kamrára.

Inkubáció az expozíciót követően

Az expozíciós idő elteltével a vizsgálati vegyi anyagot, a negatív kontrollként vagy pozitív kontrollként szolgáló vegyi anyagot el kell távolítani az elülső kamrából, és a felhámot legalább háromszor (vagy mindaddig, amíg észlelhetőek a vizsgálati vegyi anyag látható nyomai) fenolvörös indikátort tartalmazó Eagle-féle tápfolyadékkal át kell mosni. Az öblítéshez azért kell fenolvörös indikátort tartalmazó közeget használni, mert a fenolvörös indikátor színváltozásának megfigyelésével ellenőrizhető a savas és a lúgos vizsgálati vegyi anyagok leöblítésének eredményessége. A szaruhártyát háromnál többször is le kell mosni, ha a fenolvörös indikátor még mindig elszíneződik (sárgára vagy lilára) vagy ha a vizsgálati vegyi anyag még mindig látható. A közeg vizsgálati vegyi anyagtól való megtisztítását követően a szaruhártyákat utoljára át kell öblíteni (fenolvörös indikátort nem tartalmazó) Eagle-féle tápfolyadékkal. Az utolsó öblítéshez azért

▼M7

kell (fenolvörös indikátort nem tartalmazó) Eagle-féle tápfolyadékot használni, mert így biztosítható az opacitásmérés előtt a fenolvörös indikátornak az elülső kamrából való eltávolítása. Ezt követően az elülső kamrát – fenolvörös indikátor bekeverése nélkül – ismételten fel kell tölteni friss Eagle-féle tápfolyadékkal.

Folyadékok és felületaktív anyagok esetében a szaruhártyákat az öblítést követően legalább további két órán át 32 ± 1 °C hőmérsékleten inkubálni kell. Bizonyos körülmények között hasznos lehet hosszabb utóexpozíciós időt alkalmazni, amiről eseti alapon kell dönteni. A szilárd anyagokkal kezelt szaruhártyákat a négyórás expozíciós idő végén alaposan le kell öblíteni, utóinkubáció azonban nem szükséges.

Folyadékok és felületaktív anyagok esetében az expozíciót követő inkubáció végén, nem felületaktív szilárd anyagok esetében a négyórás expozciós idő elteltével minden egyes szaruhártya opacitását és permeabilitását fel kell jegyezni. Egyben minden szaruhártyát szemrevételezéssel is meg kell vizsgálni, és a releváns észrevételeket (pl. szövetleválás, vizsgálati vegyi anyag maradéka, egyenetlen fényáteresztési minták) fel kell jegyezni. Ezek a megfigyelések fontosak lehetnek, mivel azok megjelenhetnek az opaciméteren leolvasott értékek eltéréseiben is.

Kontrollként szolgáló vegyi anyagok

Minden vizsgálatban párhuzamos negatív vagy oldószeres/vivőanyagos kontrollt és pozitív kontrollt is kell alkalmazni.

Hígítatlan folyékony anyagok vizsgálatakor a vizsgálati rendszer esetleges nem jellemző változásainak kimutatása és a vizsgálat végpontjaiban figyelembe veendő kiindulási értékek meghatározása céljából a BCOP vizsgálati módszerben párhuzamos negatív kontrollt (például 0,9 %-os nátrium-klorid oldatot vagy desztillált vizet) kell alkalmazni. Az egyidejű negatív kontroll alkalmazása egyben azt is biztosítja, hogy a vizsgálat körülményei ne eredményezzenek nem kívánt irritatív hatást.

Hígított folyadékok, felületaktív anyagok és szilárd anyagok vizsgálatakor a vizsgálati rendszer esetleges nem jellemző változásainak észlelése és a vizsgálat végpontjaiban figyelembe veendő kiindulási értékek meghatározása céljából a BCOP vizsgálati módszerben párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollt kell alkalmazni. Csak olyan oldószer, illetőleg vivőanyag alkalmazható, amely igazoltan nem gyakorol káros hatást a vizsgálati rendszerre.

Az a vegyi anyag, amelyről ismert, hogy pozitív hatást vált ki, minden vizsgálatban párhuzamos pozitív kontrollként szerepel a vizsgálati rendszer integritásának és helyes működtetésének igazolása érdekében. Annak érdekében azonban, hogy a pozitív kontrollnál jelentkező hatás időbeli változása is megfigyelhető legyen, az irritatív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Folyékony vizsgálati vegyi anyagok esetében pozitív kontrollként például 100 %-os etanol vagy 100 %-os dimetil-formamid alkalmazható. Szilárd vizsgálati vegyi anyagok esetében pozitív kontrollként például 0,9 %-os nátrium-klorid-oldathoz 20 vegyesszázalék (m/V) koncentrációban adagolt imidazol alkalmazható.

A referencia-vegyianyagok jól használhatók egy adott kémiai vagy termékosztályba tartozó ismeretlen vegyi anyagok szemirritációs hatásának értékelésére vagy valamely szemirritációs anyag relatív irritatív hatásának az irritatív hatás egy adott tartományán belüli értékelésére.

Mért végpontok

Az opacitást a szaruhártyán átbocsátott fény mennyiségének mérésével kell meghatározni. A szaruhártya opacitásának kvantitatív mérése opaciméterrel történik, amely a mért opacitásértéket folyamatos skálán mutatja.

A permeabilitást a szaruhártya összes sejtrétegén (azaz a szaruhártya külső felületén a felhámtól a szaruhártya belső felületén a belhámig) áthatoló fluoreszcein-nátrium festékanyag mennyiségének mérésével kell meghatározni. A szaruhártyatartónak a felhámmal érintkező elülső kamráját 1 ml (folyadék vagy felületaktív anyag vizsgálata esetében 4 mg/ml, nem felületaktív szilárd anyag vizsgálata esetében 5 mg/ml) fluoreszcein-nátrium-oldattal, a belhámmal érintkező hátsó kamrát pedig friss EMEM oldattal kell feltölteni. A tartót ezt követően vízszintes helyzetben 90 ± 5 percig 32 ± 1 °C hőmérsékleten inkubálni kell. A hátsó

▼M7

kamrába áthatoló fluoreszcein-nátrium mennyiségének mérése ultraibolya- és látható fényes fényspektroszkópiás eljárással történik. Az eljárás keretében folyamatos skálán meg kell határozni és fel kell jegyezni a 490 nm-hez tartozó optikai sűrűségek (OD_{490}) vagy abszorbanciák értékét. A fluoreszcein permeabilitásának értékeit szabványos 1 cm-es fényút alkalmazásával, a látható fényes spektrofotométerrel mért OD_{490} értékek alapján kell meghatározni.

Az előzőekben leírt módszer alternatívájaképpen 96 lyukú mikrotiterlemez-olvasó is alkalmazható azzal a feltétellel, hogy i. a fluoreszceines OD_{490} értékek meghatározásához megállapítható a lemezolvasó lineáris tartománya, és ii. a 96 lyukú lemezen annyi fluoreszceinmintát használnak, amennyi ahhoz szükséges, hogy az így meghatározott OD_{490} értékek megegyezzenek a szabványos 1 cm-es fényúttal mért értékekkel (ehhez teljesen [általában 360 µl-rel] feltöltött lyukak lehetnek szükségesek).

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az adatok kiértékelése

Azt követően, hogy az opacitás- és az átlagos permeabilitásértékeket (OD_{490}) a háttéropacitás, illetve a negatív kontroll OD_{490} permeabilitásértékeinek figyelembevételével korrigálták, az egyes kezelt csoportok átlagos opacitás- és átlagos OD_{490} permabilitásértékeit egy kísérleti úton származtatott összefüggés segítségével kezelt csoportonként egyetlen jelzőszámmá, az *in vitro* irritációs pontszámmá (IVIS) kell alakítani:

IVIS = átlagopacitás + (15 × OD_{490} átlagpermeabilitás).

Sina és társai (16) szerint ezt a képletet belső és laboratóriumközi vizsgálatok keretében dolgozták ki. Egy több laboratóriumban 36 vegyületen elvégzett vizsgálatsorozat adatain többváltozós analízist hajtottak végre azon egyenlet meghatározása végett, amely az *in vivo* és az *in vitro* adatok között a legjobb illeszkedést biztosítja. Két különböző társaság tudományos szakemberei elvégezték ezt az analízist és közel azonos egyenleteket származtattak.

Az opacitás- és a permeabilitásértékeket egymástól függetlenül is ki kell értékelni annak meghatározására, hogy a vizsgálati vegyi anyag a korróziót vagy a súlyos irritációt nem csak a két végpont egyikében váltotta-e ki (lásd a döntési kritériumokat).

Döntési kritériumok

A vizsgálati vegyi anyagok súlyos szemkárosodást okozóként (az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába tartozóként), valamint a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS szerint kategória nélküli) vegyi anyagokként történő meghatározására szolgáló IVIS-határértékek az alábbiakban szerepelnek:

IVIS	ENSZ-GHS
≤ 3	Kategória nélküli
> 3; ≤ 55	Előrejelzés nem végezhető
> 55	1. kategória

A vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

A vizsgálat akkor minősül elfogadhatónak, ha a pozitív kontrollhoz tartozó IVIS érték az aktuális (legalább háromhavonta, illetőleg az ilyen vizsgálatot rendszertelenül, azaz havi egy alkalomnál ritkábban végző laboratóriumok esetében minden elfogadható vizsgálat után aktualizált) történeti átlag körüli két szórás intervalluma közé esik. A negatív vagy az oldószeres/vivőanyagos kontrollon tapasztalható hatásokhoz tartozó opacitás- és permeabilitásértékeknek kisebbnek kell lenniük az adott negatív kontrollal vagy oldószerrel/vivőanyaggal kezelt szarvasmarha-szaruhártya háttéropacitására és háttérpermeabilitására megállapított

▼M7

felső határnál. Ha a létrejött besorolás egyértelmű, akkor legalább három szaruhártya vizsgálatából álló egyszeri vizsgálatmenetnek elegendőnek kell lennie az adott vizsgálati vegyi anyag esetében. Az első vizsgálatmenet határesethez közeli eredményei esetében azonban fontolóra kell venni egy második vizsgálatmenetet (ez azonban nem feltétlenül szükséges), valamint egy harmadik vizsgálatmenetet is, ha az első két vizsgálatmenetnél nem egyezik meg az IVIS eredmények átlaga. Ebben az összefüggésben az első vizsgálatmenet eredménye akkor minősül határesethez közelinek, ha a három szaruhártyán alapuló előrejelzések nem egyeztek meg, például:

— a három szaruhártyából kettő eltérő előrejelzést adott a mindhárom szaruhártya átlagához viszonyítva, VAGY

— a három szaruhártyából egy a mindhárom szaruhártya átlagától eltérő előrejelzést adott, ÉS az eltérő eredmény 10-nél nagyobb IVIS-egység volt a küszöbértékhez (55) viszonyítva.

— Ha a megismételt vizsgálatmenet megerősíti az első vizsgálatmenet előrejelzését (az IVIS érték átlaga alapján), akkor további vizsgálat nélkül végleges döntést lehet hozni. Ha a megismételt vizsgálatmenet eltérő eredményt hoz az első vizsgálatmenethez képest (az IVIS érték átlaga alapján), akkor egy harmadik vizsgálatmenetet kell lefolytatni a kétértelmű előrejelzések eldöntése és a vizsgálati vegyi anyag osztályozása érdekében. Megengedhető lehet az osztályozás és a címkézés céljával végzendő további vizsgálatok elengedése, ha bármelyik vizsgálatmenet az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriát eredményez.

Vizsgálati jegyzőkönyv

A Vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia, amennyiben azok a vizsgálat lefolytatása szempontjából relevánsak:

Vizsgálati vegyi anyagok és kontrollként szolgáló vegyi anyagok

— kémiai név (nevek): a Chemical Abstracts Service (CAS) szerinti szerkezeti név, ezt követően az egyéb ismert nevek, a CAS nyilvántartási szám, ha ismertek;

— a vizsgálati, illetve a kontrollként szolgáló vegyi anyag tisztasága és összetétele (tömegszázalékban), amennyiben ezek az információk rendelkezésre állnak;

— fizikai-kémiai tulajdonságok: halmazállapot, illékonyság, pH, stabilitás, kémiai osztály, vízoldékonyság, ha a vizsgálat szempontjából relevánsak;

— a vizsgálati, illetve a kontrollként szolgáló vegyi anyagok vizsgálatot megelőző kezelése, ha történt ilyen (például melegítés, porítás);

— stabilitás, ha ismert.

A megbízó és a vizsgálatot végző laboratórium adatai

— A megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe.

A vizsgálati módszer körülményei

— az alkalmazott opaciméter (például modell és leírás) és a műszer beállításai;

— az opacitás és a permeabilitás mérésére használt műszerek (pl. opaciméter és spektrofotométer) kalibrálási adatai a mérések linearitásának biztosítása érdekében;

— a használt szaruhártyatartók típusa (például modell és leírás);

▼M7

— az egyéb berendezések leírása;

— a vizsgálati módszer időbeli integritásának (például pontosságának és megbízhatóságának) biztosítására alkalmazott módszer (például a jártassági tesztanyagok rendszeres időközönkénti vizsgálata).

A vizsgálat elfogadhatóságának kritériumai

— a párhuzamos pozitív és negatív kontrollokra vonatkozó elfogadható tartományok a történeti adatok alapján;

— adott esetben az elfogadható párhuzamos referencia-kontrolltartományok a történeti adatok alapján.

A szemek begyűjtése és preparálása

— a szemek beszerzési helyének (azaz a begyűjtési létesítményük) megjelölése;

— a szaruhártya átmérője, amellyel a donorállat életkora és a vizsgálatra való alkalmassága mérhető;

— a szemek tárolásának és szállításának körülményei (például a szemek begyűjtésének dátuma és időpontja, a vizsgálat megkezdéséig eltelt idő, a szállítóeszköz és a hőmérsékleti viszonyok, az alkalmazott antibiotikumok);

— a szarvasmarha-szaruhártyák preparálása és tárgylemezre helyezése, többek között a minőségükre, a szaruhártyatartók hőmérsékletére, valamint a vizsgálathoz felhasznált szaruhártyák kiválasztási kritériumaira vonatkozó megjegyzések.

Vizsgálati eljárás

— az alkalmazott párhuzamosok száma;

— az alkalmazott negatív és pozitív kontrollok meghatározása (adott esetben az oldószeres és a referenciakontrolloké is);

— a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja (koncentrációi), alkalmazása, expozíciós ideje és az expozíciót követő inkubáció ideje;

— az alkalmazott értékelési és döntési kritériumok leírása;

— az alkalmazott vizsgálat-elfogadhatósági kritériumok leírása;

— a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása;

— az alkalmazott döntési kritériumok leírása.

Eredmények

— minden egyes vizsgált minta adatainak táblázatos formába foglalása (például a vizsgálati vegyi anyag, a pozitív, a negatív és a referenciakontrollok [ha voltak ilyenek] opacitás-, OD490 és kiszámított IVIS értékei táblázatos formában, ideértve adott esetben a megismételt párhuzamos kísérletek adatait, valamint az egyes kísérletek esetében az átlag ± a szórás megadásával);

— a megfigyelt egyéb hatások leírása;

— a származtatott *in vitro* ENSZ-GHS besorolás, amennyiben alkalmazandó.

Az eredmények tárgyalása

Következtetés

▼M7

SZAKIRODALOM

(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. Elérhető az alábbi címen: 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. Elérhető az alábbi címen: 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. Elérhető az alábbi címen: 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. Elérhető az alábbi címen: 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. Elérhető az alábbi címen: 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. Elérhető az alábbi címen: [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) E melléklet B.5., akut toxicitás: szemirritáció/szemkorróziós hatás című fejezete.

(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. Elérhető az alábbi címen: [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).

Elérhető a következő címen: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼M7

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítőképességének mértékét mutatja, és relevanciájának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés” szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálati módszer milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket.

Referencia-vegyianyag: a vizsgálati vegyi anyaggal való összehasonlítás céljából etalonként használt vegyi anyag. A referencia-vegyianyagnak a következő tulajdonságokkal kell rendelkeznie: i. állandó és megbízható forrás(ok)ból kell származnia; ii. a vizsgálati vegyi anyagok osztályához hasonló szerkezettel és funkcionalitással kell rendelkeznie; iii. ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; iv. rendelkezésre kell állnia az ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és v. a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

Alulról építkező megközelítés: a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében feltehetőleg besorolást nem igénylő vegyi anyag esetén alkalmazott lépcsőzetes megközelítés, amely a besorolást nem igénylő vegyi anyagok (negatív eredmény) más vegyi anyagokhoz (pozitív eredmény) viszonyított meghatározásával kezdődik.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Szaruhártya: a szemgolyó elülső részén az íriszt és a pupillát fedő és a szem belsejébe a fényt bevezető, áttetsző rész.

Szaruhártya opacitása: a szaruhártya vizsgálati vegyi anyagnak való expozícióját követő átlátszatlanság mértékét leíró jellemző. Az opacitás megnövekedése a szaruhártya károsodását jelzi. Az opacitás értékelése történhet szubjektív módon (mint például a nyulakon végzett Draize-féle szemvizsgálatban) vagy objektív módszerrel (műszerrel, például opaciméterrel).

Szaruhártya permeabilitása: a szaruhártya felhámjának károsodását leíró számadat; meghatározása a szaruhártya összes sejtrétegén áthatoló fluoreszcein-nátrium festékanyag mennyiségének mérése alapján történik.

Szemirritáció: a vizsgálati vegyi anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül teljes mértékben visszafordítható szemelváltozások. Megfelel a „Reverzibilis szemkárosodás” fogalmának és az „ENSZ-GHS szerinti 2. kategóriának” (4).

Hamis negatív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen negatívnak minősített pozitív vegyi anyagok részaránya. A hamis negatív arány a vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

Hamis pozitív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen pozitívnak minősített negatív vegyi anyagok részaránya. A hamis pozitív arány a vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon velejáró sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni egy élő szervezetet, egy rendszert vagy egy (al)populációt érintő expozíciója esetén.

***In vitro* irritációs pontszám (IVIS)**: a BCOP vizsgálati módszer során alkalmazott, kísérleti úton származtatott összefüggés, amely az egyes kezelt csoportok opacitásának és permeabilitásának átlagértékeit minden egyes kezelt csoportra egyetlen *in vitro* pontszám formájában fejezi ki. *IVIS* = átlagopacitás + (15 x átlagpermeabilitás).

Irreverzibilis szemkárosodás: lásd: „Súlyos szemkárosodás”.

▼M7

Keverék: két vagy több anyagból álló keverék vagy oldat, amelyben az anyagok nem lépnek egymással reakcióba (4).

Negatív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó kezeletlen replikátum. Ezt a mintát a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt dolgozzák fel annak megállapítása érdekében, hogy az oldószer kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Nem besorolt: a szemirritáció tekintetében (az ENSZ-GHS szerinti 2., 2A. vagy 2B. kategóriába tartozóként) nem besorolt vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében (az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába tartozóként) nem besorolt vegyi anyagok. Megfeleltethető az ENSZ-GHS szerinti „kategória nélküli” vegyi anyagoknak.

Opaciméter: a szaruhártya fényátbocsátását kvantitatív módon értékelő, a szaruhártya opacitásának mérésére alkalmazott műszer. Rendszerint két kamrából áll, amelyek mindegyike saját fényforrással és fotocellával van ellátva. Az egyik kamrában helyezkedik el a kezelt szaruhártya, míg a másik a műszer kalibrálására és alaphelyzetbe állítására szolgál. Egy kontrollrekeszt (folyadékkal nem töltött üres kamra ablakok nélkül) halogénlámpa fényével átvilágítanak, a fényt fotocellával érzékelik, és ezt összevetik a szaruhártyát tartalmazó kamrát magában foglaló vizsgálati rekeszen átvezetett, fotocellával érzékelt fénnyel. A fotocellák segítségével mért fényátbocsátás eltérését összevetik, és az ebből adódó számszerű opacitásérték digitális kijelzőn jelenik meg.

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó vegyi anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollválaszban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Reverzibilis szemkárosodás: lásd: „Szemirritáció”.

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik.

Súlyos szemkárosodás: a vizsgálati vegyi anyagnak a szem külső felületére való juttatását követő olyan szövetkárosodás kialakulása, vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a behatást követő 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben. Megfeleltethető az „Irreverzibilis szemkárosodás” fogalmának és az „ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriának” (4).

Oldószeres/vivőanyagos kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét az oldószerrel vagy vivőanyaggal együtt tartalmazó kezeletlen minta, amelyet hozzáadnak a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákhoz és más kontrollmintákhoz, és ennek alapján megállapíthatók az ugyanazon oldószerben oldott vagy vivőanyaggal felvitt vizsgálati vegyi anyaggal kezelt minták kiindulási értékei. A minta párhuzamos negatív kontrollal elvégzett vizsgálatával az is megállapítható, hogy az oldószer vagy vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Anyag: természetes állapotban előforduló vagy ipari termelőfolyamatból származó kémiai elemek és azok vegyületei, amelyek a termék stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagokat és az alkalmazott folyamatból származó szennyeződéseket is tartalmazhatnak, de nem tartalmaznak olyan oldószereket, amelyek az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltozása nélkül elkülöníthetők (4).

▼M7

Felületaktív anyag: olyan anyag (például mosószer), amely képes csökkenteni a folyadékok felületi feszültségét, és így lehetővé tenni azok habképződését vagy szilárd anyagokba történő bejutását.

Felületaktív anyagot tartalmazó keverék: e vizsgálati módszer összefüggésében olyan keverék, amely egy vagy több felületaktív anyagot tartalmaz, 5 %-nál magasabb végső koncentrációban.

Felülről építkező megközelítés: a feltehetőleg súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyag esetén alkalmazott lépcsőzetes megközelítés, amely a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok (pozitív eredmény) más vegyi anyagokhoz (negatív eredmény) viszonyított meghatározásával kezdődik.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Többszintű vizsgálati stratégia: olyan lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amelynek keretében a vizsgálati vegyi anyagra vonatkozó valamennyi információt meghatározott sorrendben áttekintik, és az egyes szinteken az adatok bizonyító erejének elemzésével meghatározzák, hogy a következő szintre való továbblépés előtt a veszélyességi osztályozásra vonatkozó döntéshez elegendő információ áll-e rendelkezésre. Ha a vizsgálati vegyi anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján megállapítható, további vizsgálatra nincs szükség. Ha a vizsgálati vegyi anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján nem állapítható meg, több lépcsőben egymás után állatkísérleteket kell végezni mindaddig, amíg az egyértelmű besorolás meg nem állapítható.

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (4).

ENSZ-GHS szerinti 1. kategória: lásd: „Súlyos szemkárosodás”.

ENSZ-GHS szerinti 2. kategória: lásd: „Szemirritáció”.

ENSZ-GHS szerinti nem besorolt: az ENSZ-GHS szerinti 1. vagy 2. (2A. vagy 2B.) kategóriába való besorolás követelményeinek nem megfelelő vegyi anyagok. Megfelelnek a „Kategória nélküli” vegyi anyagoknak.

Validált vizsgálati módszer: olyan vizsgálati módszer, amelynek az adott céllal kapcsolatos relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága validálási vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a validált vizsgálati módszer a javasolt felhasználási célra nem feltétlenül kínál megfelelő pontosságú és megbízhatóságú elfogadható eljárást.

Az adatok bizonyító erejének mérlegelése: a rendelkezésre álló különféle érvek és ellenérvek mérlegelésének folyamata az adott vegyi anyag veszélyességével kapcsolatban a megfelelő következtetés levonása és alátámasztása céljából.

▼M7

2. függelék

A BCOP VIZSGÁLATI MÓDSZER PREDIKTÍV ÉRTÉKE

1. táblázat

A BCOP vizsgálatnak a súlyos szemkárosodást okozó [ENSZ-GHS/ CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába, illetve nem 1. kategóriába (2. kategóriába tartozó + kategória nélküli); US EPA szerinti I. kategóriába, illetve nem I. kategóriába (II. + III. + IV. kategóriába) tartozó] vegyi anyagok azonosításával kapcsolatos prediktív értéke

Osztályozási rendszer	Szám	Pontosság		Érzékenység		Hamis negatív arányok		Specifikusság		Hamis pozitív arányok	
		%	Szám	%	Szám	%	Szám	%	Szám	%	Szám
ENSZ-GHS CLP-rendelet	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

2. táblázat

A BCOP vizsgálatnak a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő („szemirrtációt nem okozó") [az ENSZ-GHS/a CLP-rendelet szerint be nem sorolt, illetve nem „nem besorolt" (1. + 2. kategóriába tartozó); US EPA szerinti IV. kategóriába, illetve nem IV. kategóriába (I. + II. + III. kategóriába) tartozó] vegyi anyagok azonosításával kapcsolatos prediktív értéke

Osztályozási rendszer	Szám	Pontosság		Érzékenység		Hamis negatív arányok		Specifikusság		Hamis pozitív arányok	
		%	Szám	%	Szám	%	Szám	%	Szám	%	Szám
ENSZ-GHS CLP-rendelet	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

3. függelék

JÁRTASSÁGI TESZTANYAGOK A BCOP VIZSGÁLATI MÓDSZERHEZ

E vizsgálati módszer rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1. táblázatban ajánlott 13 vegyi anyag szemet érintő veszélyességi osztályozásának helyes meghatározásával kell igazolniuk szakmai jártasságukat. E vegyi anyagok kiválasztása úgy történt, hogy a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (405. vizsgálati iránymutatás) (17) eredményei és az ENSZ-GHS osztályozási rendszer (azaz az 1., 2A., 2B. vagy nem besorolt) alapján a szemet érintő veszélyek hatástartománya szempontjából reprezentatívak legyenek (4). A kiválasztás másik kritériuma az volt, hogy a vegyi anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, azokra vonatkozóan kiváló minőségű *in vivo* referenciaadatok álljanak rendelkezésre, és a BCOP vizsgálati módszer alapján kiváló minőségű *in vitro* adatok álljanak rendelkezésre. A referenciaadatok az ésszerűsített összefoglaló dokumentumban (3) és a BCOP vizsgálati módszer felülvizsgálatára vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumban (2) (18) találhatók.

1. táblázat

A BCOP vizsgálati módszerben való szakmai jártasság ellenőrzéséhez ajánlott vegyi anyagok

Vegyi anyag	CASRN	Kémiai osztály ([1])	Halmazállapot	*In Vivo* besorolás ([2])	BCOP szerinti besorolás
Benzalkónium-klorid (5 %)	8001-54-5	Óniumvegyület	Folyadék	1. kategória	1. kategória
Klórhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Szilárd	1. kategória	1. kategória
Dibenzoil-L-borkősav	2743-38-6	Karbonsav, észter	Szilárd	1. kategória	1. kategória
Imidazol	288-32-4	Heterociklikus	Szilárd	1. kategória	1. kategória
Triklór-ecetsav (30 %)	76-03-9	Karbonsav	Folyadék	1. kategória	1. kategória
2,6-Diklór-benzoilklorid	4659-45-4	Savhalogenid	Folyadék	2A. kategória	Pontos/megbízható előrejelzés nem végezhető
Etil-2-metilaceto-acetát	609-14-3	Keton, észter	Folyadék	2B. kategória	Pontos/megbízható előrejelzés nem végezhető
Ammónium-nitrát	6484-52-2	Szervetlen só	Szilárd	2. kategória ([3])	Pontos/megbízható előrejelzés nem végezhető
EDTA, dikálium-só	25102-12-9	Amin, karbonsav (só)	Szilárd	Nincs besorolás	Nincs besorolás
Tween 20	9005-64-5	Észter, poliéter	Folyadék	Nincs besorolás	Nincs besorolás
2-merkatopirimidin	1450-85-7	Savhalogenid	Szilárd	Nincs besorolás	Nincs besorolás
Fenilbutazon	50-33-9	Heterociklikus	Szilárd	Nincs besorolás	Nincs besorolás

▼M7

Vegyi anyag	CASRN	Kémiai osztály (1)	Halmazállapot	*In Vivo* besorolás (2)	BCOP szerinti besorolás
Polioxietilén-23 lauril éter (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alkohol	Folyadék	Nincs besorolás	Nincs besorolás

Rövidítések: CASRN = a Chemical Abstracts Service (CAS) szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám).

(1) Az egyes vegyi anyagok kémiai osztályának meghatározása standard osztályozási rendszer alkalmazásával, a National Library of Medicine „Medical Subject Headings" (MeSH) elnevezésű osztályozási rendszere (elérhető a következő címen: http//www.nlm.nih.gov/mesh) alapján történt.

(2) A nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (az OECD 405. vizsgálati iránymutatása) (17) eredményei alapján és az ENSZ-GHS (4) felhasználásával.

(3) A 2A. vagy 2B. kategóriába sorolás az ENSZ-GHS rendszerének a két kategória megkülönböztetésére szolgáló kritériuma értelmezésétől függ, azaz három állatból egynél, illetve három állatból kettőnél a hetedik napon jelentkező hatások szükségesek a 2A. kategóriába soroláshoz. Az *in vivo* vizsgálatot három állaton végezték. Egy állaton a kötőhártya vörösségétől eltekintve minden végpont begyógyul, nulla pontos lesz a hetedik napra vagy korábban. Annak az egy állatnak, amely nem gyógyult meg teljesen a hetedik napra, a kötőhártya vörösségét értékelő pontszáma 1 volt (a hetedik napon), majd a 10. napon teljesen meggyógyult.

▼M7

4. függelék

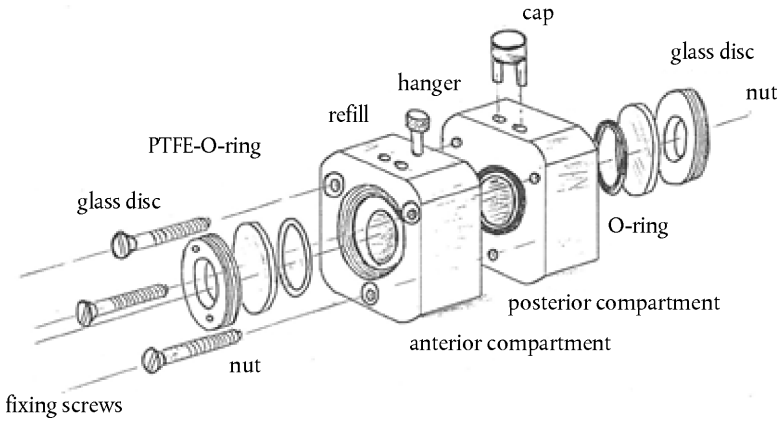
SZARUHÁRTYATARTÓ A BCOP VIZSGÁLATHOZ

A BCOP vizsgálathoz alkalmazott szaruhártyatartó inert anyagból (például polipropilénből) készül. A tartó két részből (elülső és hátsó kamrából) áll, és két, egymáshoz hasonló hengeres belső kamrával rendelkezik. Mindkét kamra kb. 5 ml-nyi mennyiség befogadására alkalmas és üvegablakban végződik, amelyen keresztül az opacitás mérését rögzítik. Mindkét belső kamra átmérője 1,7 cm, mélysége 2,2 cm. ([1]) A szivárgás megelőzésére a hátsó kamrában tömítőgyűrű található. A szaruhártyákat a belhámi oldalukkal lefelé kell a hátsó kamra tömítőgyűrűjére fektetni, majd az elülső kamrákat a szaruhártyák felhámi oldalára kell elhelyezni. A kamrákat a kamrák külső peremén található három, rozsdamentes acélból készült csavar rögzíti. Az egyes kamraházak végén üvegablak található, amely a szaruhártyához való könnyebb hozzáférés érdekében eltávolítható. A szivárgás megelőzésére az üvegablak és a kamra között is van egy tömítőgyűrű. Mindegyik kamra tetején két nyílás található, amelyen keresztül betölthető és üríthető a közeg és a vizsgálati vegyi anyagok. A kezelési és az inkubációs időszak alatt ezeket a nyílásokat gumikupak zárja le. A szaruhártyatartókon keresztüli fényátbocsátás megváltozhat, mivel a belső kamra lyukainak vagy az üvegablakoknak a kopása vagy elhasználódása vagy a felületükön egyes kémiai maradékanyagok felhalmozódása befolyásolhatja a fényszóródást vagy -visszaverődést. Ez a szaruhártyatartókon keresztüli kiindulási fényátbocsátás (és ennek megfelelően a leolvasott kiindulási opacitásértékek) növekedését vagy csökkenését idézheti elő, és az egyes kamrákban mért szaruhártya-opacitás várható kiindulási értékében bekövetkezett jelentős változásban nyilvánulhat meg (azaz a szaruhártya-opacitás kezdeti értékei az egyes szaruhártyatartókban szokásosan 2 vagy 3 opacitásegységgel eltérhetnek a várt kiindulási értékektől). A vizsgálati vegyi anyagok jellegétől és a kamrák használatának gyakoriságától függően minden laboratóriumnak meg kell fontolnia a szaruhártyatartókon keresztüli fényátbocsátás változásainak értékelésére vonatkozó program kialakítását. A kiindulási értékek meghatározásához a szaruhártyatartók a rutinszerű használat előtt a teljes közeggel töltött, szaruhártyát nem tartalmazó kamrák kiindulási opacitásértékeinek (vagy fényátbocsátásának) mérésével ellenőrizhetők. A szaruhártyatartókat ezt követően rendszeresen ellenőrizni kell a használati ideje alatti fényátbocsátás változása szempontjából. A vizsgálati vegyi anyagok, a használatuk gyakorisága és a szaruhártya-opacitás kiindulási értékei változásának megfigyelése alapján minden laboratórium megállapíthatja a szaruhártyatartók ellenőrzésének gyakoriságát. Ha a szaruhártyatartókon keresztüli fényátbocsátás jelentős változása figyelhető meg, mérlegelni kell a szaruhártyatartók belső felületének megfelelő takarítását és/vagy tisztítását, illetve a szaruhártyatartók cseréjét.

([1]) A megadott méretek 12–60 hónapos tehenekhez használt szaruhártyatartókon alapulnak. 6–12 hónapos egyedek esetében a tartót úgy kell kialakítani, hogy mindkét kamra térfogata 4 ml, a belső kamrák átmérője 1,5 cm, mélysége pedig 2,2 cm legyen. Új típusú szaruhártyatartók esetében nagyon fontos, hogy a vizsgálati vegyi anyagnak kitett szaruhártya-felület és a hátsó karma térfogatának hányadosa megegyezzen a hagyományos szaruhártyatartó hasonló adatával. Ez azért szükséges, hogy az IVIS javasolt képletébe beírandó permeabilitásértékek helyesen legyenek meghatározva.

▼M7

Szaruhártyatartó: bontott diagram



▼M7

5. függelék

AZ OPACIMÉTER

Az opaciméter a fényátbocsátás mérésére szolgáló műszer. Például az Electro Design (Riom, Franciaország) által gyártott, a BCOP vizsgálati módszer validálása során használt OP-KIT berendezés esetében egy halogénlámpa fényét kontrollrekeszen (ablaktalan, illetve folyadékkal nem töltött üres kamrán) keresztül egy fotocellához juttatják és összevetik a szaruhártyát tartalmazó kamrát magában foglaló vizsgálati rekeszen átvezetett, a fotocellával érzékelt fénnyel. A fotocellák segítségével mért fényátbocsátás eltérését összevetik, és az ebből adódó számszerű opacitásérték digitális kijelzőn jelenik meg. Ennek alapján történik az opacitásegységek megállapítása. Ettől eltérő beállítású (például a kontroll- és a kísérleti kamra párhuzamos mérését nem igénylő) opaciméter-típusok használhatók, ha bizonyítottan a validált berendezéséhez hasonló eredményeket adnak.

Az opaciméternek az előrejelző modellben leírt különféle besorolásokhoz tartozó határértékek által kijelölt tartományokban (vagyis a szemkorróziót, illetve a súlyos irritatív hatást meghatározó határértékig) lineáris viselkedést kell tanúsítania. Annak érdekében, hogy a leolvasások 75–80 opacitásegységig lineárisak és pontosak legyenek, az opacimétert több kalibrátorral kell kalibrálni. A kalibrátorokat a kalibrációs kamrába (a kalibrátorok tartására átalakított szaruhártyakamrába) kell helyezni, és leolvasást kell végezni az opaciméteren. A kalibrációs kamrákat úgy kell kialakítani, hogy a kalibrátorok a fényforrástól és a fotocellától ugyanolyan távolságra helyezkedjenek el, mint a szaruhártyák az opacitásmérés során. A referenciaértékek és a kezdeti beállított pont a használt berendezés típusától függ. Az opacitásmérés linearitását megfelelő (műszerspecifikus) eljárásokkal kell biztosítani. Az Electro Design (Riom, Franciaország) által gyártott OP-KIT berendezés esetében például az opacimétert először 0 opacitásegységre kalibrálják oly módon, hogy a kalibrációs kamrát használják, kalibrátort nem. Ezt követően három különböző kalibrátort kell egyenként a kalibrációs kamrába helyezni, és mérni kell az opacitást. Az első, a második és a harmadik kalibrátor behelyezésekor rendre az előre beállított 75, 150 és 225 (± 5 % tűrés) opacitásegységet kell tudni leolvasni.

▼M7

B.48. IZOLÁLT CSIRKESZEM VIZSGÁLATÁN ALAPULÓ VIZSGÁLATI MÓDSZER I. A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁST OKOZÓ VEGYI ANYAGOK ÉS II. A SZEMIRRITÁCIÓ VAGY A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁS TEKINTETÉBEN BESOROLÁST NEM IGÉNYLŐ VEGYI ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA

BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 438. vizsgálati iránymutatásában (2013) leírt módszerrel. Az izolált csirkeszem vizsgálatán alapuló vizsgálati módszert (a továbbiakban: ICE vizsgálati módszer) az alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottság (ICCVAM) az Alternatív Módszerek Validálásával Foglalkozó Európai Központtal (ECVAM) és az Alternatív Módszerek Validálásával Foglalkozó Japán Központtal (JaCVAM) együtt értékelte 2006-ban és 2010-ben (1) (2) (3). Az első értékelés során az ICE vizsgálati módszert a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által globálisan harmonizált rendszerében (GHS) (1) (2) (4), illetve az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletben ([1]) (CLP-rendelet) meghatározott, súlyos szemkárosodást okozó (1. kategóriába tartozó) vegyi anyagok (anyagok és keverékek) azonosítására szolgáló szűrővizsgálatkénti használatra tudományosan megalapozott vizsgálati módszerként támogatták. A második értékelés során abból a szempontból értékelték az ICE vizsgálati módszert, hogy mennyire hasznos az ENSZ-GHS-ben meghatározott, a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében nem besorolt vegyi anyagok (3) (4) azonosításához. A validálási vizsgálat eredményei és a szakértői értékelő testület ajánlásai megtartották az ICE vizsgálati módszernek a súlyos szemkárosodást okozó (az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába tartozó) vegyi anyagok besorolásához történő alkalmazására vonatkozó eredeti ajánlást, mivel a rendelkezésre álló adatbázis nem változott az ICCVAM általi eredeti validálás óta. Ebben a szakaszban az ICE vizsgálati módszer alkalmazási területének más kategóriákkal való bővítésére vonatkozó további ajánlásokat nem fogalmaztak meg. A validációs vizsgálatban használt *in vitro* és *in vivo* adatkészlet ismételt értékelése során arra helyeződött a hangsúly, hogy az ICE vizsgálati módszer mennyire hasznos a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosításában (5). Ez az ismételt értékelés azt állapította meg, hogy az ICE vizsgálati módszer az ENSZ-GHS-ben meghatározott, a szemirritáció és a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására is alkalmazható (4) (5). Ez a vizsgálati módszer az ICE vizsgálati módszer ajánlott alkalmazásait és korlátait ezen értékelések alapján tartalmazza. Az OECD vizsgálati iránymutatásának eredeti, 2009-es változata és frissített, 2013-as változata közötti legfőbb eltérések többek között, de nem kizárólag a következők: az ICE vizsgálati módszernek az ENSZ-GHS osztályozási rendszer szerint besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására történő alkalmazása, a Vizsgálati jegyzőkönyv elemeinek frissítése, a fogalommeghatározásokat tartalmazó 1. függelék frissítése és a jártassági tesztanyagokról szóló 2. függelék frissítése.

Jelenleg általánosan elfogadott, hogy az előre látható jövőben egyetlen *in vitro* szemirritációs vizsgálat sem tudja majd helyettesíteni a Draize-féle *in vivo* szemvizsgálatot a különböző kémiai osztályoknál felmerülő irritáció teljes skálájának előrejelzésére. Előfordulhat azonban, hogy egy-egy (többszintű) vizsgálati stratégián belüli több alternatív vizsgálati módszer stratégiai kombinációja helyettesíteni tudja a Draize-féle *in vivo* szemvizsgálatot (6). A felülről építkező megközelítés (7) akkor alkalmazandó, ha a meglévő információk alapján valamely vegyi anyag várhatóan rendkívül irritáló hatású lehet, míg az alulról építkező megközelítés (7) akkor alkalmazandó, ha a meglévő információk alapján valamely vegyi anyag várhatóan nem okoz a besorolás szükségességéhez elegendő szemirritációt. Az ICE vizsgálati módszer bizonyos körülmények között és a 8–10. pontban

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 2008. december 16-i 1272/2008/EK rendelete az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353., 2008.12.31., 1. o.).

▼M7

meghatározott korlátokkal a vegyi anyagok szemet érintő veszélyességükre tekintettel történő osztályozására és címkézésére alkalmazható *in vitro* vizsgálati módszer. Bár az ICE vizsgálati módszer nem minősül a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatot önállóan helyettesítő vizsgálati módszernek, első lépésként ajánlott a Scott és társai (7) által javasolt felülről építkező megközelítéshez hasonló vizsgálati stratégia keretében a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok, azaz a további vizsgálat nélkül az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába sorolandó vegyi anyagok (4) azonosítására. Az ICE vizsgálati módszer ajánlott az ENSZ-GHS-ben meghatározott, a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS szerinti nem besorolt) vegyi anyagok azonosítására (4), ezért első lépésként használható az alulról építkező megközelítésben (7). Azonban az a vegyi anyag, amely az ICE vizsgálati módszerrel előreláthatólag nem okoz súlyos szemkárosodást vagy nem tartozik a szemirritáció/súlyos szemkárosodás tekintetében nem besorolt anyagok közé, további (*in vitro* és/vagy *in vivo*) vizsgálatot tenne szükségessé a végleges osztály megállapításához. Ezenfelül az ICE vizsgálati módszernek az ENSZ-GHS-től eltérő osztályozási rendszeren belüli, alulról építkező megközelítés keretében történő alkalmazásáról egyeztetni kell a megfelelő szabályozó hatóságokkal.

E vizsgálati módszer célja a vizsgálati vegyi anyag szemet érintő veszélyességi potenciáljának értékelésére alkalmazott eljárások ismertetése annak alapján, hogy a csirkéből eltávolított csirkeszemben képes-e toxicitást kiváltani. A szaruhártyára gyakorolt toxikus hatások jellemzése i. az opacitás kvalitatív értékelésével, ii. a szembe juttatott fluoreszcein következtében bekövetkező felhámkárosodás (fluoreszcein-visszatartás) kvalitatív értékelésével, iii. a megvastagodás (felduzzadás) kvantitatív mérésével és iv. a felület makroszkopikus morfológiai károsodásának kvalitatív értékelésével történik. A szaruhártya vizsgálati vegyi anyagnak való expozícióját követően megállapítható szaruhártya-opacitás, felduzzadás és károsodás értékelését külön-külön kell végezni, majd ezekből a jellemzőkből együttesen kell származtatni az ún. szemirritációs osztályt.

A fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

Ez a vizsgálati módszer a 160. OECD-iránymutatásban (8) javasolt protokollon alapul, melynek kidolgozására az alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottság (ICCVAM) nemzetközi validálási vizsgálatát (1) (3) (9) követően, az alternatív módszerek validálásával foglalkozó európai, illetve japán központ (ECVAM, JaCVAM), valamint a hollandiai TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology kutatószervezet részvételével került sor. A protokoll alapját publikált protokollokból származó információk, valamint a TNO által használt jelenlegi protokoll képezik (10) (11) (12) (13) (14).

A vizsgálati módszer alapjául szolgáló validálás során igen sokféle vegyi anyag vizsgálatára sor került, és a validálási vizsgálat empirikus adatbázisa összesen 152 vegyi anyagot, ezen belül 72 anyagot és 80 keveréket tartalmazott (5). A vizsgálati módszer szilárd anyagokra, folyadékokra, emulziókra és gélekre alkalmazandó. A folyadékok lehetnek vizesek vagy nem vizesek; a szilárd anyagok lehetnek vízben oldódóak vagy oldhatatlanok. Gázokat és aeroszolokat validálási vizsgálat keretében még nem vizsgáltak.

Az ICE vizsgálati módszer alkalmazható a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok, azaz az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába (4) sorolandó vegyi anyagok azonosítására. Erre a célra történő alkalmazásakor az ICE vizsgálati módszer azonosított korlátai az alkoholok esetében tapasztalt hamis pozitív arányokon, valamint a szilárd és a felületaktív anyagok esetében tapasztalt hamis negatív arányon alapulnak (1) (3) (9). Ebben az összefüggésben azonban a hamis negatív arányok (az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriának nem az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriakénti azonosítása) nem kritikus jelentőségűek, mivel minden negatív eredményű vizsgálati vegyi anyag vizsgálatára sor kerülne más, megfelelően validált *in vitro* vizsgálattal (vizsgálatokkal), vagy utolsó lehetőségként – a szabályozási követelményektől függően, az adatok bizonyító erejének mérlegelésén

▼M7

alapuló megközelítés keretébe tartozó lépcsőzetes vizsgálati stratégia segítségével – nyulakon végzett vizsgálatokkal. Megjegyzendő, hogy a szilárd anyagok változó és szélsőséges expozíciós körülményekhez vezethetnek a Draize-féle *in vivo* szemirritációs vizsgálat során, ami a tényleges irritációs hatásukra (15) vonatkozó irreleváns előrejelzéseket eredményezhet. A vizsgálók valamennyi típusú vegyi anyag esetében mérlegelhetik e vizsgálati módszer alkalmazását, amellyel a pozitív eredményt súlyos szemkárosodásra utaló jelként, azaz további vizsgálat nélkül az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába sorolandóként kell elfogadni. Az alkoholok esetében azonban a kapott pozitív eredményeket a túlzó előrejelzés kockázata miatt óvatosan kell értelmezni.

A súlyos szemkárosodást okozó (az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába tartozó) vegyi anyagok azonosítására történő alkalmazásakor az ICE vizsgálati módszer általános pontossága 86 % (120/140), hamis pozitív aránya 6 % (7/113), hamis negatív aránya pedig 48 % (13/27) a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálati módszer ENSZ-GHS osztályozási rendszer (4) (5) szerint besorolt adataival való összevetéskor.

Az ICE vizsgálati módszer az ENSZ-GHS osztályozási rendszer (4) szerint a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására is alkalmazható. Az ICE vizsgálati módszernek az ENSZ-GHS-től eltérő osztályozási rendszeren belüli, alulról építkező megközelítés keretében történő alkalmazásáról egyeztetni kell a megfelelő szabályozó hatóságokkal. Ez a vizsgálati módszer valamennyi típusú vegyi anyagra alkalmazható, amellyel a negatív eredményt a szemirritáció és a súlyos szemkárosodás tekintetében nem besorolandóként kell elfogadni. A validációs adatbázisból származó egy eredmény alapján azonban előfordulhat, hogy a rothadásgátló szerves oldószert tartalmazó festékek előrejelzése nem megfelelő (5).

A szemirritáció vagy súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására történő alkalmazásakor az ICE vizsgálati módszer általános pontossága 82 % (125/152), hamis pozitív aránya 33 % (26/79), hamis negatív aránya pedig 1 % (1/73) a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálati módszer ENSZ-GHS osztályozási rendszer szerint besorolt adataival való összevetéskor (4) (5). Amikor bizonyos kémiai osztályokba tartozó vizsgálati vegyi anyagok (például rothadásgátló szerves oldószert tartalmazó festékek) nem szerepelnek az adatbázisban, az ICE vizsgálati módszer pontossága 83 % (123/149), hamis pozitív aránya 33 % (26/78), hamis negatív aránya pedig 0 % (0/71) az ENSZ-GHS osztályozási rendszer vonatkozásában (4) (5).

Az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába tartozó, az ENSZ-GHS szerinti 2., 2A. vagy 2B. kategóriába alulosztályozott vegyi anyagok, valamint az ENSZ-GHS szerint be nem sorolt kategóriába tartozó, az ENSZ-GHS szerinti 2., 2A. vagy 2B. kategóriába felülosztályozott vegyi anyagok jelentős száma miatt az ICE vizsgálati módszer nem ajánlott olyan vizsgálati vegyi anyagok azonosítására, amelyeket szemirritáló hatásúként (azaz az ENSZ-GHS szerinti 2. vagy 2A. kategóriába tartozóként) kell besorolni, illetve olyan vizsgálati vegyi anyagok azonosítására, amelyeket enyhén szemirritáló hatásúként (az ENSZ-GHS szerinti 2B. kategóriába tartozóként) kell besorolni. E célból egy másik megfelelő módszerrel végzett további vizsgálatra lehet szükség.

A csirkeszemmel végzett valamennyi eljárás során be kell tartani a vizsgáló intézménynek az emberi és az állati eredetű anyagok – ideértve többek között, de nem kizárólag a szöveteket és a szöveti folyadékokat – kezelésére vonatkozó rendelkezéseit és eljárásait. Ajánlott továbbá követni az általános laboratóriumi óvintézkedéseket is (16).

Bár az ICE vizsgálati módszer nem veszi figyelembe a nyulakon végzett szemirritációs vizsgálatban értékelt kötőhártya- és íriszsérüléseket, foglalkozik a szaruhártyára kifejtett hatásokkal, amelyek leginkább befolyásolják az *in vivo* besorolást az ENSZ-GHS osztályozás alkalmazásában. Másrészről, noha maga az ICE vizsgálat nem alkalmas a szaruhártya-léziók visszafordíthatóságának értékelésére, nyulakon végzett szemvizsgálatok alapján korábban javasolták, hogy a szaruhártya-sérülés kezdeti mélységének értékelése alkalmas lehet a visszafordíthatatlan hatások bizonyos típusainak azonosítására (17). Különösen további tudományos

▼M7

ismeretekre van szükség annak megértésére, hogy a kezdeti nagyon súlyos sérüléssel össze nem függő visszafordíthatatlan hatások hogyan következnek be. Végezetül az ICE vizsgálat nem alkalmas a szembe kerülés következtében fellépő szisztémás toxicitási potenciál megítélésére.

Ez a vizsgálati módszer rendszeres időközönkénti frissítés tárgyát fogja képezni az új információk és adatok figyelembevételekor. Például kórszövettani vizsgálatok esetlegesen hasznosak lehetnek, ha a szaruhártya-károsodás teljesebb körű jellemzésére van szükség. E lehetőség értékelése érdekében a felhasználóknak érdemes tartósítaniuk a szaruhártyákat és azokból kórszövettani mintákat preparálniuk, amelyek felhasználhatóak a vizsgálati módszer pontosságát esetlegesen tovább javító adatbázis fejlesztéséhez és döntési kritériumok kidolgozásához. Az OECD kidolgozott egy *in vitro* szemtoxicitás-vizsgálati módszerekről szóló útmutatót, amely a kórszövettani minták gyűjtésére vonatkozó részletes eljárásokat, valamint arra vonatkozó információkat tartalmaz, hogy hová kell benyújtani a mintákat és/vagy a kórszövettani adatokat (8).

Minden olyan laboratóriumnak, amely a vizsgálatot először alkalmazza, a 2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok felhasználásával ajánlatos meggyőződnie felkészültségéről. Mielőtt a laboratórium az ICE vizsgálat adatait a szabályozói követelmények szerinti veszélyességi osztályozás céljaira rendelkezésre bocsátaná, e vegyi anyagok vizsgálatával demonstrálhatja az ICE vizsgálati módszer végrehajtásában való szakmai jártasságát.

A VIZSGÁLAT ELVE

Az ICE vizsgálat olyan organotipikus módszer, amely rövid távon *in vitro* fenntartja a csirkeszem működését. A módszerrel a vizsgálati vegyi anyag által okozott károsodás jellemzése a szaruhártya felduzzadásának, opacitásának és fluoreszcein-visszatartásának értékelése útján történik. Míg e két utóbbi paraméter kvalitatív értékelést igényel, a szaruhártya felduzzadásának elemzése kvantitatív módszerrel történik. A mérési eredményeket az általános irritációs index kiszámításához használatos kvantitatív pontszámmá vagy a szemet *in vitro* érintő veszélyesség osztályozásához használatos kvalitatív kategóriává, azaz az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriává vagy az ENSZ-GHS szerinti nem besorolttá kell alakítani. Ezt követően ezen eredmények bármelyike felhasználható a vizsgálati vegyi anyag potenciálisan súlyos *in vivo* szemkárosodást okozó hatásának vagy annak előrejelzésére, hogy az anyagot nem kell a szemet érintő veszélyességi osztályozás szerint besorolni (lásd a döntési kritériumokat). Nem sorolhatók be azonban az ICE vizsgálati módszer előrejelzései szerint súlyos szemkárosodást nem okozó, illetve nem besorolt vegyi anyagok (lásd a 11. pontot).

A csirkeszemek származása és életkora

A múltban a vizsgálathoz vágóhídról beszerzett, emberi fogyasztás céljából leölt csirkékből nyert szemeket használtak, ami biztosította, hogy nem kellett laboratóriumi állatokat tartani. Csak az emberi élelmiszerláncba való bekerülésre alkalmas, egészséges állatokból nyert szemek használhatóak fel.

Bár a csirkék optimális életkorának felmérése céljából nem végeztek ellenőrzött vizsgálatot, a vizsgálat céljára igénybe vett csirkék életkora és tömege a hagyományosan vágóhídra kerülő vágócsirkék életkorának és tömegének felel meg (azaz kb. 7 hetes, 1,5-2,5 kg tömegű csirkék).

A szemek begyűjtése és beszállítása a laboratóriumba

A csirke elkábítását (mely rendszerint elektromos sokkal történik) és a nyak kivéreztetési célú bemetszését követően a fejet azonnal el kell távolítani. Annak érdekében, hogy a csirkefejeket a vágóhídról a károsodás és/vagy bakteriális fertőzés megelőzéséhez szükséges gyorsasággal a laboratóriumba lehessen szállítani, célszerű a laboratórium közelében helyi beszerzési forrást találni. A vizsgálat elfogadhatósági kritériumai betartásának biztosítása érdekében a csirkefejek begyűjtése és a szemek enukleáció utáni szuperfúziós kamrába helyezése közötti időnek a lehető legrövidebbnek kell lennie (ennek jellemzően két órán belül meg kell történnie). A vizsgálatban felhasznált valamennyi szemnek egy meghatározott napon begyűjtött szemállományból kell származnia.

▼M7

Mivel a szemeknek a fejből való kimetszése a laboratóriumban történik, az egész fejeket szobahőmérsékleten (jellemzően 18 °C és 25 °C közötti hőmérsékleten), fiziológiás sóoldattal nedvesített kendőkkel párásított műanyag dobozokban kell a vágóhídról a laboratóriumba szállítani.

Az ICE vizsgálatban felhasznált szemek kiválasztási kritériumai és a szemek száma

A vizsgálatból ki kell zárni azokat a szemeket, amelyek esetében a kivételt követően nagy (0,5-nél nagyobb) a fluoreszceines foltosodás kiindulási értéke vagy a szaruhártya-opacitási pontszám.

Minden kezelt csoportnak és a párhuzamos pozitív kontrollcsoportnak legalább három szemből kell állnia. A negatív, illetve – ha az oldószer nem sóoldat – az oldószeres kontrollcsoportnak legalább egy szemből kell állnia.

A GHS szerint nem besorolt eredményhez vezető szilárd anyagok esetében ajánlott három szemmel egy második vizsgálatmenetet is végrehajtani a negatív eredmény megerősítése vagy elvetése érdekében.

ELJÁRÁS

A szemek előkészítése

A szemhéjat óvatosan be kell metszeni, ügyelve a szaruhártya sérülésének elkerülésére. Ezután a szaruhártya épségét a szaruhártya felületére néhány másodpercre felvitt, majd izotóniás sóoldattal leöblített, egy cseppnyi 2 vegyesszázalékos (m/V) nátrium-fluoreszcein alkalmazásával mielőbb értékelni kell. A fluoreszceinnel kezelt szemeket ezután réslámpás mikroszkóppal meg kell vizsgálni, és ellenőrizni kell, hogy a szaruhártya nem sérült-e meg (vagyis a fluoreszcein-visszatartási és a szaruhártya-opacitási pontszám legfeljebb 0,5 lehet).

Ha a szem sérüléstől mentes, akkor el kell távolítani a koponyából, ügyelve a szaruhártya sérülésének elkerülésére. A szemgolyót – a pislogóhártyát sebészeti csipesszel feszesen tartva – ki kell húzni a szemüregből, és a szemizmokat tompa hegyű hajlított ollóval át kell vágni. A szaruhártya túlzott nyomás miatti károsodásának (azaz a nyomásos mesterséges szövetelváltozásnak) a kerülése fontos.

A szemnek a szemüregből való eltávolításakor a szemidegből egy szabad szemmel is jól látható részt rajta kell hagyni. A szemet a szemüregből való eltávolítást követően nedvszívó párnára kell helyezni, majd le kell vágni róla a pislogóhártyát és az egyéb kötőszöveteket.

A kivett szemet korrózióálló acél csíptetőre kell erősíteni oly módon, hogy a szaruhártya függőleges helyzetben legyen. A csíptetőt ezt követően be kell helyezni a szuperfúziós készülék egyik kamrájába (18). A csíptetőt a szuperfúziós készülékben úgy kell elhelyezni, hogy az izotóniás sóoldat cseppjei (percenként 3–4 csepp, illetve percenként 0,1–0,15 ml) a teljes szaruhártyát érjék. A szuperfúziós készülék kamráinak hőmérsékletét 32 ± 1,5 °C-on kell tartani. A 3. függelék bemutatja a szuperfúziós készülék jellemző kialakítását és a szemcsíptetőket; ezek az eszközök kereskedelmi forgalomban is kaphatók, de saját használatra is megépíthetők. A készülék az egyes laboratóriumok igényeinek (például a vizsgálandó szemek számának) megfelelően módosítható.

A szemeket a szuperfúziós készülékbe való behelyezés után ismét meg kell vizsgálni réslámpás mikroszkóppal annak ellenőrzésére, hogy az előkészítés során nem sérültek-e meg. A réslámpás mikroszkóp mélységmérőjével ekkor a szaruhártya csúcsán meg kell mérni a szaruhártya vastagságát is. Ki kell cserélni azokat a szemeket, i. amelyeknek fluoreszcein-visszatartási pontszáma 0,5-nél nagyobb, ii. amelyeknek szaruhártya-opacitása 0,5-nél nagyobb, valamint iii. amelyek a károsodás bármely további jelét mutatják. Az e szempontok alapján ki nem zárt szemek közül ki kell zárni mindazokat, amelyek szaruhártya-vastagsága az összes szem átlagától 10 %-kal nagyobb mértékben eltér. A felhasználóknak tisztában kell lenniük azzal, hogy a réslámpás mikroszkópok különböző résbeállítás esetén eltérő szaruhártya-vastagságot adhatnak. A résszélességet 0,095 mm-re kell állítani.

▼M7

Valamennyi szem megvizsgálása és jóváhagyása után a szemeket körülbelül 45–60 percig inkubálni kell annak érdekében, hogy a vizsgálandó anyag felvitele előtt a vizsgálati rendszerrel ekvilibrálódjanak. A kiegyenlítődési idő eltelte után fel kell jegyezni a kiindulási (azaz a nulla időpillanatban érvényes) szaruhártya-vastagságot és opacitást. E végpont tekintetében az előkészítéskor meghatározott fluoreszcein-pontszámot kell kiindulási értékként használni.

A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása

A kiindulási referenciamérések után a szemeket (tartójukkal együtt) azonnal ki kell venni a szuperfúziós készülékből, vízszintes helyzetbe kell hozni, majd fel kell vinni a vizsgálati vegyi anyagot a szaruhártyára.

A folyékony vizsgálati vegyi anyagokat általában hígítatlan állapotban kell vizsgálni, de szükség esetén (például ha a vizsgálati terv így rendelkezik) hígítás is alkalmazható. Hígított vizsgálati vegyi anyagok esetén lehetőleg fiziológiás sóoldatot kell alkalmazni. Ellenőrzött körülmények között másféle oldószer is használható, a fiziológiás sóoldattól eltérő oldószerek megfelelőségét azonban külön igazolni kell.

A folyékony vizsgálati vegyi anyagokat oly módon kell felvinni a szaruhártya felületére, hogy a szaruhártya teljes felületét egyenletesen befedje. A szabványos mennyiség 0,03 ml.

A szilárd vegyi anyagokat lehetőleg dörzscsészében, mozsárban vagy hasonló őrlőeszközben a lehető legfinomabbra kell őrölni. A port oly módon kell felvinni a szaruhártya felületére, hogy azt a vizsgálati vegyi anyag egyenletesen befedje; a szabványos mennyiség 0,03 g.

A (folyékony vagy szilárd) vizsgálati vegyi anyagot 10 másodpercig hatni kell hagyni, majd szobahőmérsékleten le kell öblíteni (kb. 20 ml) izotóniás sóoldattal. Ezt követően a szemet (tartójával együtt) az eredeti függőleges helyzetben vissza kell helyezni a szuperfúziós készülékbe. Szükség esetén a 10 másodperces felvitelt követően és későbbi időpontokban (például a vizsgálati vegyi anyag maradványainak a szaruhártyán való felfedezésekor) további öblítés alkalmazható. Az öblítéshez kiegészítőként használt sóoldat mennyisége általában nem kritikus jelentőségű, a vegyi anyag szaruhártyához tapadásának észlelése azonban fontos.

Kontrollként szolgáló vegyi anyagok

Minden vizsgálatban párhuzamos negatív vagy oldószeres/vivőanyagos kontrollt és pozitív kontrollt is kell alkalmazni.

Hígítatlan folyadékok és szilárd anyagok vizsgálatakor a vizsgálati rendszer esetleges nem jellemző változásainak észlelése céljából és annak biztosítására, hogy a vizsgálat körülményei ne eredményezzenek tévesen irritatív hatást, az ICE vizsgálatban párhuzamos negatív kontrollként fiziológiás sóoldatot kell alkalmazni.

Hígított folyadékok vizsgálatakor a vizsgálati rendszer esetleges nem jellemző változásainak kimutatása céljából és annak biztosítására, hogy a vizsgálat körülményei ne eredményezzenek tévesen irritatív hatást, az ICE vizsgálatban párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollt kell alkalmazni. A 31. pontban foglaltaknak megfelelően csak olyan oldószer, illetőleg vivőanyag alkalmazható, amely igazoltan nem gyakorol káros hatást a vizsgálati rendszerre.

Annak ellenőrzése érdekében, hogy a kiváltott hatás megfelelő-e, minden egyes kísérletben ismerten szemirritációt okozó anyagot is vizsgálni kell párhuzamos pozitív kontrollként. Mivel az ICE vizsgálat célja a szemkorróziót és a súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítása, a pozitív kontrollnak olyan referencia-vegyianyagnak kell lennie, amely ebben a vizsgálati módszerben súlyos hatást vált ki. Annak érdekében azonban, hogy a pozitív kontrollnál jelentkező hatás időbeli változása is megfigyelhető legyen, a súlyos hatás nem lehet túlságosan

▼M7

erőteljes. A pozitív kontrollra vonatkozóan megfelelő mennyiségű *in vitro* adatot kell generálni oly módon, hogy kiszámítható legyen a pozitív kontroll statisztikailag meghatározott elfogadható tartománya. Ha egy adott pozitív kontrollra vonatkozóan nincs elegendő korábbi adat az ICE vizsgálati módszer alkalmazásából, akkor ezen adatok előállításához külön vizsgálatok lehetnek szükségesek.

Folyékony vizsgálati vegyi anyagok esetében pozitív kontrollként például 10 %-os ecetsav vagy 5 %-os benzalkónium-klorid, szilárd vizsgálati vegyi anyagok esetében pedig például nátrium-hidroxid vagy imidazol alkalmazható.

A referencia-vegyianyagok jól használhatók egy adott kémiai vagy termékosztályba tartozó ismeretlen vegyi anyagok szemirritációs hatásának értékelésére vagy valamely szemirritációs anyag relatív irritatív hatásának az irritatív hatás egy adott tartományán belüli értékelésére.

Mért végpontok

A kezelt szaruhártyákat a kezelés előtt, majd a kezelést követő leöblítés után 30, 75, 120, 180 és 240 perc (± 5 perc) elteltével kell értékelni. Ezek az időpontok a négyórás kezelési időn belül megfelelő mennyiségű mérést adnak, miközben a mérések között elegendő idő marad valamennyi szem szükséges megfigyelésének elvégzésére.

Az értékelt végpontok: a szaruhártya opacitása, felduzzadása, fluoreszcein-visszatartása és morfológiai elváltozásai (például a felhám benyomódása vagy fellazulása). A fluoreszcein-visszatartás kivételével (amelyet csak a kezelés előtt és a vizsgálati vegyi anyagnak való expozíció után 30 perccel kell meghatározni) minden végpontot valamennyi fenti időpontban meg kell határozni.

A szaruhártya opacitásának, fluoreszcein-visszatartásának, morfológiai elváltozásainak és – lebonyolítás esetén – kórszövettani vizsgálatának dokumentálására ajánlott fényképeket készíteni.

A négy óra elteltével végrehajtott utolsó vizsgálatot követően ajánlatos a szemeket az esetleges kórszövettani vizsgálathoz megfelelő fixálóban (például semleges pufferolt formalinban) tartani (a részletekért lásd a 14. pontot és a (8) hivatkozást.

A szaruhártya felduzzadását a réslámpás mikroszkóp optikai pachométerével végzett szaruhártyavastagság-mérésekből kell meghatározni. A felduzzadást százalékos arányként kell kifejezni, és a következő képletből, a mért szaruhártya-vastagságok felhasználásával kell kiszámítani:

$$\left(\frac{\textit{szaruhártya} - \textit{vastagság t időpontban} - \textit{szaruhártya} - \textit{vastagság 0 időpontban}}{\textit{szaruhártya} - \textit{vastagság 0 időpontban}} \right) \times 100$$

Minden megfigyelési időpontban meg kell határozni az összes vizsgált szem szaruhártya-felduzzadásának átlagos százalékos arányát. A bármely időpontban megfigyelt szaruhártya-felduzzadás átlagértékének maximuma alapján minden vizsgálati vegyi anyaghoz átfogó jellemzést adó pontszámot kell rendelni (lásd az 51. pontot).

Az 1. táblázatban szemléltetett szaruhártya-opacitási pontszámot a szaruhártya legsűrűbben opálos területe alapján kell megállapítani. Minden megfigyelési időpontban meg kell határozni az összes vizsgált szem szaruhártya-opacitásának átlagát. A bármely időpontban megfigyelt szaruhártya-opacitási pontszámok átlagának maximuma alapján minden vizsgálati vegyi anyaghoz átfogó jellemzést adó pontszámot kell rendelni (lásd az 51. pontot).

▼M7

1. táblázat

Szaruhártya-opacitási pontszámok

Pontérték	Észrevétel
0	Nincs opálosodás
0,5	Nagyon halvány opálosodás
1	Szórt vagy zavaros területek; az írisz részletei tisztán kivehetőek
2	Könnyen észrevehető áttetsző terület; az írisz részletei kissé elmosódottak
3	Súlyos szaruhártya-opacitás; az írisznek egyetlen részlete sem vehető ki, a pupilla mérete alig érzékelhető
4	A szaruhártya teljes opálosodása; az írisz nem látható

A fluoreszcein-visszatartást kizárólag a 30 perc elteltével végzett megfigyelési időpontban kell értékelni a 2. táblázatban foglaltak szerint. A 30 perc elteltével végzett megfigyelés időpontjában meg kell határozni az összes vizsgált szem fluoreszcein-visszatartásának átlagát, és ennek alapján minden vizsgálati vegyi anyaghoz átfogó jellemzést adó pontszámot kell rendelni (lásd az 51. pontot).

2. táblázat

Fluoreszcein-visszatartási pontszámok

Pontérték	Észrevétel
0	Nincs fluoreszcein-visszatartás
0,5	Igen csekély mértékű, egysejtes foltosodás
1	Egysejtes foltosodás elszórtan a szaruhártya kezelt felületén
2	Fokális vagy egybefüggő, sűrű egysejtes foltosodás
3	A szaruhártya nagy egybefüggő területei tartanak vissza fluoreszceint

A morfológiai elváltozások között megemlítendő a szaruhártya felhámsejtjeinek „benyomódása”, a felhám „fellazulása”, a szaruhártya felületének „érdesedése” és a vizsgálati vegyi anyag „feltapadása” a szaruhártya felületére. Ezek a megfigyelések különböző súlyosságúak lehetnek, és egyidejűleg is előfordulhatnak. E megállapítások besorolása a vizsgáló szubjektív megítélésétől függ.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az adatok kiértékelése

A szaruhártya opacitását, felduzzadását és fluoreszcein-visszatartását külön-külön kell értékelni, és az egyes végpontokhoz külön-külön ICE-osztályt kell megállapítani. Ezt követően az egyes végpontokhoz tartozó ICE-osztályok együttes figyelembevételével meg kell határozni az egyes vizsgálati vegyi anyagok irritációs besorolását.

Döntési kritériumok

Az egyes végpontok értékelését követően az ICE-osztályok megállapítását előre meghatározott tartományok alapján kell elvégezni. A szaruhártya-felduzzadás (3. táblázat), a szaruhártya-opacitás (4. táblázat) és a fluoreszcein-visszatartás (5. táblázat) jellemzése az alábbiakban bemutatott skálákon, négy ICE-osztály alkalmazásával történik. Fontos megjegyezni, hogy a 3. táblázatban feltüntetett szaruhártya-felduzzadási pontszámok csak akkor érvényesek, ha a vastagság

▼M7

mérése (például Haag-Streit BP900 típusú) 1. számú mélységmérő tartozékkal felszerelt és $9\frac{1}{2}$-re (0,095 mm) állított résszélességű réslámpás mikroszkóppal történik. A felhasználóknak tisztában kell lenniük azzal, hogy a réslámpás mikroszkópok különböző résbeállítás esetén eltérő szaruhártya-vastagságot adhatnak.

3. táblázat

A szaruhártya-felduzzadás besorolási kritériumai az ICE vizsgálatban

Szaruhártya-felduzzadás átlaga (%) (*)	ICE-osztály
0-tól 5-ig	I.
5-nél nagyobb, 12-ig	II.
12-nél nagyobb, 18-ig (a kezelés után több mint 75 perccel)	II.
12-nél nagyobb, 18-ig (a kezelés után legfeljebb 75 perccel)	III.
18-nál nagyobb, 26-ig	III.
26-nál nagyobb, 32-ig (a kezelés után több mint 75 perccel)	III.
26-nál nagyobb, 32-ig (a kezelés után legfeljebb 75 perccel)	IV.
32-nél nagyobb	IV.

(*) Bármely időpontban megfigyelt legmagasabb átlag.

4. táblázat

Az opacitás besorolási kritériumai az ICE vizsgálatban.

Opacitás maximális átlaga (*)	ICE-osztály
0,0–0,5	I.
0,6–1,5	II.
1,6–2,5	III.
2,6–4,0	IV.

(*) Bármely időpontban megfigyelt pontszámok legmagasabb átlaga (az 1. táblázatban meghatározott opacitási pontszámok alapján)

5. táblázat

A fluoreszcein-visszatartás átlagának besorolási kritériumai az ICE vizsgálatban

Fluoreszcein-visszatartás átlaga a kezelés után 30 perccel (*)	ICE-osztály
0,0–0,5	I.
0,6–1,5	II.
1,6–2,5	III.
2,6–3,0	IV.

(*) A 2. táblázatban meghatározott pontszámok alapján.

A vizsgálati vegyi anyag *in vitro* irritációs besorolását a szaruhártya opacitása, felduzzadása és a 6. táblázatban ismertetett fluoreszcein-visszatartása alapján meghatározott kategóriák kombinációjának megfelelő GHS-osztályozás leolvasásával kell értékelni.

▼M7

6. táblázat

Összesített *in vitro* besorolás

ENSZ-GHS osztályozás	A három végpont kombinációi
Kategória nélküli	3 × I 2 × I, 1 × II
Előrejelzés nem végezhető	Egyéb kombinációk
1. kategória	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) 30 percnél a szaruhártya opacitása legalább 3 (legalább két szem esetében) Bármely időpontban a szaruhártya opacitása 4 (legalább két szem esetében) A felhám súlyos fellazulása (legalább egy szem esetében)

(*) Kevésbé valószínű kombinációk.

A vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

A vizsgálat akkor minősül elfogadhatónak, ha a párhuzamos negatív vagy vivőanyagos/oldószeres kontrollokat a GHS szerint nem besorolt anyagként, a párhuzamos pozitív kontrollokat pedig a GHS szerinti 1. kategóriába tartozóként azonosítják.

Vizsgálati jegyzőkönyv

A Vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia, amennyiben azok a vizsgálat lefolytatása szempontjából relevánsak:

Vizsgálati vegyi anyag és kontrollként szolgáló vegyi anyagok

— kémiai név (nevek): a Chemical Abstracts Service (CAS) szerinti szerkezeti név, ezt követően az egyéb ismert nevek, ha vannak;

— a CAS szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám), ha ismert;

— a vizsgálati, illetve a kontrollként szolgáló vegyi anyagok tisztasága és összetétele (tömegszázalékban), amennyiben ezek az információk rendelkezésre állnak;

— fizikai-kémiai tulajdonságok: halmazállapot, illékonyság, pH, stabilitás, kémiai osztály, vízoldékonyság, ha a vizsgálat szempontjából relevánsak;

— a vizsgálati, illetve a kontrollként szolgáló vegyi anyagok vizsgálatot megelőző kezelése, ha történt ilyen (például melegítés, porítás);

— stabilitás, ha ismert.

A megbízó és a vizsgálatot végző laboratórium adatai

— a megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe;

— a szemek beszerzési helyének (pl. a begyűjtési létesítményük) megjelölése.

A vizsgálati módszer körülményei

— az alkalmazott vizsgálati rendszer leírása;

▼M7

— az alkalmazott réslámpás mikroszkóp (például modell) és annak műszerbeállításai;

— a történeti negatív és pozitív kontrollok eredményeire való hivatkozás, valamint adott esetben az elfogadható párhuzamos referencia-kontrolltartományokat igazoló történeti adatok;

— a vizsgálati módszer időbeli integritásának (például pontosságának, megbízhatóságának) biztosítására alkalmazott módszer (például jártassági tesztanyagok rendszeres időközönkénti vizsgálata).

A szemek begyűjtése és preparálása

— a donorállat életkora és tömege, valamint adott esetben egyéb sajátosságai (például ivara, törzse), ha rendelkezésre állnak;

— a szemek tárolásának és szállításának körülményei (például a szemek begyűjtésének dátuma és időpontja, a csirkefejek begyűjtése és az eltávolított szemek szuperfúziós kamrába helyezése között eltelt idő);

— a szemek preparálása és tárgylemezre helyezése, többek között a minőségükre, a szemtartó kamrák hőmérsékletére, valamint a vizsgálathoz felhasznált szemek kiválasztási kritériumaira vonatkozó kijelentések.

Vizsgálati eljárás

— az alkalmazott párhuzamosok száma;

— az alkalmazott negatív és pozitív kontrollok meghatározása (adott esetben az oldószeres és a referenciakontrolloké is);

— a vizsgálati vegyi anyag dózisa, alkalmazása és expozíciós ideje;

— megfigyelési időpontok (a kezelés előtt és után);

— az alkalmazott értékelési és döntési kritériumok leírása;

— az alkalmazott vizsgálat-elfogadhatósági kritériumok leírása;

— a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása.

Eredmények

— az egyes szemek esetében az egyes megfigyelési időpontokban kapott szaruhártya-felduzzadási, -opacitási és fluoreszcein-visszatartási pontszámok táblázatos formába foglalása, feltüntetve az összes vizsgált szem minden egyes megfigyelési időpontjában kapott átlagát is;

— a megfigyelt szaruhártya-felduzzadási, -opacitási és fluoreszcein-visszatartási átlagok maximuma (bármely időpontban) és a kapcsolódó ICE-osztály;

— minden más megfigyelt hatás leírása;

— a származtatott *in vitro* GHS osztályozás;

— a szemekről készült fényképek (ha vannak).

Az eredmények tárgyalása

Következtetés

▼**M7**

SZAKIRODALOM

(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. Elérhető az alábbi címen: 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. Elérhető az alábbi címen: 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. Elérhető az alábbi címen: 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. Elérhető a következő címen: 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) E melléklet B.5., akut toxicitás: szemirritáció/szemkorróziós hatás című fejezete.

(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. Elérhető a következő címen: 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. Elérhető az alábbi címen: 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. Elérhető az alábbi címen: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf.

(17) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼M7

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítőképességét mutatja, és relevanciájának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés” szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálati módszer milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket.

Referencia-vegyianyag: a vizsgálati vegyi anyaggal való összehasonlítás céljából etalonként használt vegyi anyag. A referencia-vegyianyagnak a következő tulajdonságokkal kell rendelkeznie: i. állandó és megbízható forrás(ok)ból kell származnia; ii. a vizsgálati vegyi anyagok osztályához hasonló szerkezettel és funkcionalitással kell rendelkeznie; iii. ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; iv. rendelkezésre kell állnia az ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és v. a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

Alulról építkező megközelítés: a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében feltehetőleg besorolást nem igénylő vegyi anyag esetén alkalmazott lépcsőzetes megközelítés, amely a besorolást nem igénylő vegyi anyagok (negatív eredmény) más vegyi anyagokhoz (pozitív eredmény) viszonyított meghatározásával kezdődik.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Szaruhártya: a szemgolyó elülső részén az íriszt és a pupillát fedő és a szem belsejébe a fényt bevezető, áttetsző rész.

Szaruhártya opacitása: a szaruhártya vizsgálati vegyi anyagnak való expozícióját követő átlátszatlanság mértékét leíró jellemző. Az opacitás megnövekedése a szaruhártya károsodását jelzi.

Szaruhártya felduzzadása: az ICE vizsgálatban a szaruhártya vizsgálati vegyi anyagnak való expozícióját követő felpuffadása mértékét objektív módon jellemző érték. Százalékos arányként kell kifejezni, és a szaruhártya-vastagság kiindulási (a vizsgálati vegyi anyag felvitele előtti) értékéből és az ICE vizsgálat során vizsgált vizsgálati vegyi anyagnak való expozíciót követően rendszeres időközönként végzett mérésekből kell kiszámítani. A szaruhártya felduzzadásának foka jelzi a szaruhártya károsodásának mértékét.

Szemirritáció: a vizsgálati vegyi anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül teljes mértékben visszafordítható szemelváltozások. Megfelel a „Reverzibilis szemkárosodás” fogalmának és az „ENSZ-GHS szerinti 2. kategóriának” (4).

Hamis negatív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen negatívnak minősített pozitív vegyi anyagok részaránya. A hamis negatív arány a vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

Hamis pozitív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen pozitívnak minősített negatív vegyi anyagok részaránya. A hamis pozitív arány a vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

Fluoreszcein-visszatartás: az ICE vizsgálatban a szaruhártya felhámsejtjeiben a vizsgálati vegyi anyagnak való expozíciót követően visszatartott fluoreszcein-nátrium mennyiségét szubjektív módon jellemző adat. A fluoreszcein-visszatartás foka utal a szaruhártyafelhám károsodásának mértékére.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

Irreverzibilis szemkárosodás: lásd: „Súlyos szemkárosodás” és „ENSZ-GHS szerinti 1. kategória”.

▼M7

Keverék: két vagy több anyagból álló keverék vagy oldat, amelyben az anyagok nem lépnek egymással reakcióba (4).

Negatív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó kezeletlen replikátum. Ezt a mintát a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt kell feldolgozni annak megállapításához, hogy az oldószer kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Nem besorolt: a szemirritáció tekintetében (az ENSZ-GHS szerinti 2. kategóriába tartozóként) nem besorolt vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében (az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába tartozóként) nem besorolt vegyi anyagok. Megfelelnek az „ENSZ-GHS szerinti nem besorolt” vegyi anyagoknak.

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó vegyi anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a súlyos hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik.

Reverzibilis szemkárosodás: lásd: „Súlyos szemkárosodás” és „ENSZ-GHS szerinti 2. kategória”.

Súlyos szemkárosodás: a vizsgálati vegyi anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a beadást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben. Megfelel az „Irreverzibilis szemkárosodás” fogalmának és az „ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriának” (4).

Réslámpás mikroszkóp: a szem binokuláris mikroszkóp nagyítása alatti, álló sztereoszkópiás kép alkotásával történő közvetlen vizsgálatára alkalmazott műszer. Az ICE vizsgálatban a műszer a csirkeszem elülső szerkezeteinek, illetve a mélységmérő tartozékkal a szaruhártya vastagságának objektív mérésére használatos.

Oldószeres/vivőanyagos kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét az oldószerrel vagy vivőanyaggal együtt tartalmazó nem kezelt minta, amelyet a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt kell feldolgozni az ugyanazon oldószerben feloldott vagy ugyanazon vivőanyaggal felvitt vizsgálati vegyi anyaggal kezelt minták kiindulási értékeinek megállapítása érdekében. Párhuzamos negatív kontrollal elvégzett vizsgálata esetén ez a minta azt is bizonyítja, hogy az oldószer vagy vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Anyag: természetes állapotban előforduló vagy termelőfolyamatból származó kémiai elemek és azok vegyületei, amelyek a termék stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagokat és az alkalmazott folyamatból származó szennyeződéseket is tartalmazhatnak, de nem tartalmaznak olyan oldószereket, amelyek az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltozása nélkül elkülöníthetők (4).

Felületaktív anyag: olyan anyag (például mosószer), amely csökkentheti a folyadékok felületi feszültségét, és így lehetővé teszi, hogy habozzanak vagy áthatoljanak szilárd anyagokon; nedvesítőszerként is ismert.

▼M7

Felülről építkező megközelítés: a feltehetőleg súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyag esetén alkalmazott lépcsőzetes megközelítés, amely a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok (pozitív eredmény) más vegyi anyagokhoz (negatív eredmény) viszonyított meghatározásával kezdődik.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Többszintű vizsgálati stratégia: olyan lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amelynek keretében a vizsgálati vegyi anyagra vonatkozó valamennyi információt meghatározott sorrendben áttekintik, és az egyes szinteken az adatok bizonyító erejének elemzésével meghatározzák, hogy a következő szintre való továbblépés előtt a veszélyességi osztályozásra vonatkozó döntéshez elegendő információ áll-e rendelkezésre. Ha a vizsgálati vegyi anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján megállapítható, további vizsgálatra nincs szükség. Ha a vizsgálati vegyi anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján nem állapítható meg, több lépcsőben egymás után állatkísérleteket kell végezni mindaddig, amíg az egyértelmű besorolás meg nem állapítható.

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (4).

ENSZ-GHS szerinti 1. kategória: lásd: „Súlyos szemkárosodás” és/vagy „Irreverzibilis szemkárosodás”.

ENSZ-GHS szerinti 2. kategória: lásd: „Szemirritáció” és/vagy „Reverzibilis szemkárosodás”.

ENSZ-GHS szerinti „nem besorolt”: az ENSZ-GHS szerinti 1. vagy 2. (2A. vagy 2B.) kategóriába való besorolás követelményeinek nem megfelelő vegyi anyagok. Megfelelnek a „Nem besorolt” vegyi anyagoknak.

Validált vizsgálati módszer: olyan vizsgálati módszer, amelynek az adott céllal kapcsolatos relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága validálási vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a validált vizsgálati módszer a javasolt felhasználási célra nem feltétlenül kínál megfelelő pontosságú és megbízhatóságú elfogadható eljárást.

Az adatok bizonyító erejének mérlegelése: a rendelkezésre álló különféle érvek és ellenérvek mérlegelésének folyamata az adott vegyi anyag veszélyességével kapcsolatban a megfelelő következtetés levonása és alátámasztása céljából.

▼M7

2. függelék

JÁRTASSÁGI TESZTANYAGOK AZ ICE VIZSGÁLATI MÓDSZERHEZ

Az e vizsgálati módszerre támaszkodó vizsgálati módszer rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1. táblázatban ajánlott 13 vegyi anyag szemet érintő veszélyességi osztályozásának helyes meghatározásával kell igazolniuk szakmai jártasságukat. E vegyi anyagok kiválasztása úgy történt, hogy a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (405. vizsgálati iránymutatás) eredményei és az ENSZ-GHS osztályozási rendszer (azaz az 1., 2A., 2B. vagy kategória nélküli) alapján a szemet érintő veszélyek hatástartománya szempontjából reprezentatívak legyenek (4) (6). A kiválasztás másik kritériuma az volt, hogy a vegyi anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, azokra vonatkozóan kiváló minőségű *in vivo* referenciaadatok álljanak rendelkezésre, és az ICE vizsgálati módszer alapján kiváló minőségű *in vitro* adatok álljanak rendelkezésre. A referenciaadatok az ésszerűsített összefoglaló dokumentumban (5) és az ICE vizsgálati módszer felülvizsgálatára vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumban (9) találhatók.

1. táblázat

Az ICE vizsgálati módszerben való szakmai jártasság ellenőrzéséhez ajánlott vegyi anyagok

Vegyi anyag	CASRN	Kémiai osztály ([1])	Halmazállapot	*In Vivo* besorolás ([2])	*In Vitro* besorolás ([3])
Benzalkónium-klorid (5 %)	8001-54-5	Óniumvegyület	Folyadék	1. kategória	1. kategória
Klórhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Szilárd	1. kategória	1. kategória
Dibenzoil-L-borkősav	2743-38-6	Karbonsav, észter	Szilárd	1. kategória	1. kategória
Imidazol	288-32-4	Heterociklikus	Szilárd	1. kategória	1. kategória
Triklór-ecetsav (30 %)	76-03-9	Karbonsav	Folyadék	1. kategória	1. kategória
2,6-Diklórbenzoil-klorid	4659-45-4	Savhalogenid	Folyadék	2A. kategória	Előrejelzés nem végezhető ([4])
Ammónium-nitrát	6484-52-2	Szervetlen só	Szilárd	2A. kategória ([5])	Előrejelzés nem végezhető ([4])
Etil-2-metilaceto-acetát	609-14-3	Keton, észter	Folyadék	2B. kategória	Előrejelzés nem végezhető ([4])
Dimetil-szulfoxid	67-68-5	Szerves kénvegyület	Folyadék	Kategória nélküli	Kategória nélküli
Glicerin	56-81-5	Alkohol	Folyadék	Kategória nélküli	Kategória nélküli (határeset)
Metil-ciklopentán	96-37-7	Szénhidrogének (ciklikus)	Folyadék	Kategória nélküli	Kategória nélküli
n-Hexán	110-54-3	Szénhidrogén (acikli-kus)	Folyadék	Kategória nélküli	Kategória nélküli

▼**M7**

Vegyi anyag	CASRN	Kémiai osztály ([1])	Halmazállapot	*In Vivo* besorolás ([2])	*In Vitro* besorolás ([3])
Triacetin	102-76-1	Lipid	Folyadék	Nem osztályozott	Kategória nélküli

Rövidítések: CASRN = a Chemical Abstracts Service (CAS) szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám).

([1]) Az egyes vegyi anyagok kémiai osztályának meghatározása standard osztályozási rendszer alkalmazásával, a National Library of Medicine „Medical Subject Headings” (MeSH) elnevezésű osztályozási rendszere (elérhető a következő címen: http//www.nlm.nih.gov/mesh) alapján történt.

([2]) A nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (az OECD 405. vizsgálati iránymutatása) eredményei alapján és az ENSZ-GHS (4) (6) felhasználásával.

([3]) Az ICE vizsgálat 6. táblázatban ismertetett eredményei alapján.

([4]) A 6. táblázatban a GHS szerint nem besorolt és a GHS szerinti 1. kategóriába tartozó vegyi anyagokra vonatkozóan ismertetett ICE-pontszámoktól eltérő ICE-pontszámok kombinációja (lásd a 6. táblázatot).

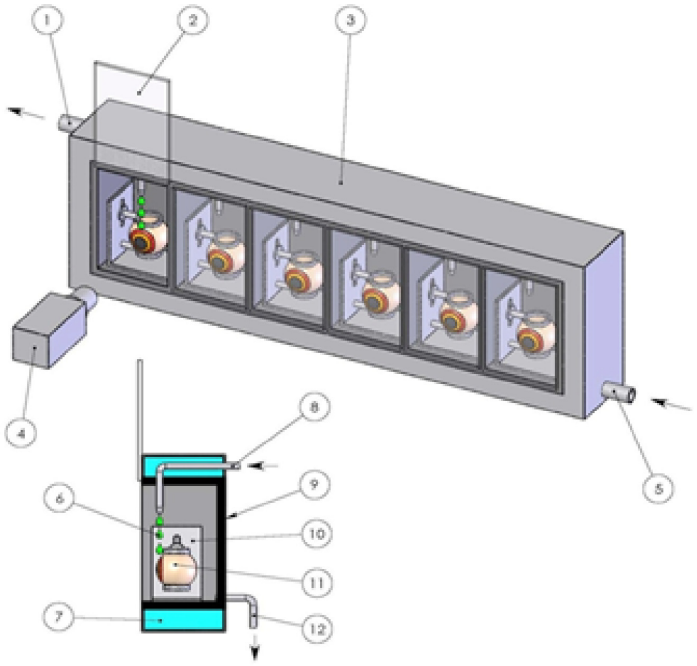
([5]) A 2A. vagy 2B. kategóriába sorolás az ENSZ-GHS rendszerének a két kategória megkülönböztetésére szolgáló kritériuma értelmezésétől függ, azaz három állatból egynél, illetve három állatból kettőnél a hetedik napon jelentkező hatások szükségesek a 2A. kategóriába soroláshoz. Az *in vivo* vizsgálatot három állaton végezték. Egy állaton a kötőhártya vörösségétől eltekintve minden végpont begyógyul, nulla pontos lesz a hetedik napra vagy korábban. Annak az egy állatnak, amely nem gyógyult meg teljesen a hetedik napra, a kötőhártya vörösségét értékelő pontszáma 1 volt (a hetedik napon), majd a 10. napon teljesen meggyógyult.

▼M7

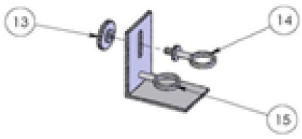
3. függelék

AZ ICE VIZSGÁLATHOZ SZUPERFÚZIÓS KÉSZÜLÉKET ÉS SZEMCSÍPTETŐKET SZEMLÉLTETŐ ÁBRÁK

(A szuperfúziós készülék és a szemcsíptető további általános leírását lásd: Burton et al. (18))



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Tétel	Megnevezés	Tétel	Megnevezés
1	melegvíz-kifolyónyílás	9	kamra
2	csúszóajtó	10	szemtartó
3	szuperfúziós készülék	11	csirkeszem
4	optikai mérőműszer	12	sóoldat-kifolyónyílás
5	melegvíz-befolyónyílás	13	állítócsavar
6	sóoldat	14	állítható felső kar
7	meleg víz	15	rögzített alsó kar
8	sóoldat-befolyónyílás		

▼M7

B.49. *IN VITRO* CELLULÁRIS MIKRONUKLEUSZ-VIZSGÁLAT EMLŐSÖKÖN

BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 487. vizsgálati iránymutatásával (2016). Ez a vizsgálati módszer a genetikai toxikológiai vizsgálati módszerek sorozatának részét képezi. Kidolgozásra került egy, a genetikai toxikológiai vizsgálatokról tömör tájékoztatást nyújtó, a vizsgálati iránymutatások közelmúltbeli változásait áttekintő OECD-dokumentum (1).

Az *in vitro* mikronukleusz-vizsgálat (a továbbiakban: MNvit vizsgálat) interfázisban lévő sejtek citoplazmájában mikronukleuszok (MN) kimutatására szolgáló genotoxicitási vizsgálat. A mikronukleuszok acentrikus (vagyis centroméra nélkül rendelkező) kromoszómatöredékekből vagy olyan ép kromoszómákból származhatnak, amelyek a sejtosztódás anafázisa során nem képesek a sejtpólusokra vándorolni. Ezért az MNvit vizsgálat olyan *in vitro* módszer, amely átfogó alapot szolgáltat a kromoszóma-károsító potenciál *in vitro* vizsgálatához, ugyanis a vizsgálati vegyi anyagnak való expozíció során vagy után sejtosztódáson átesett sejtekben aneugének és klasztogének egyaránt kimutathatók (2) (3) (további részletekért lásd a 13. pontot). A mikronukleuszok olyan károsodást jeleznek, amely átkerült az utódsejtekbe, míg a metafázisban lévő sejtekben értékelt kromoszóma-rendellenességek nem feltétlenül öröklődnek. A változások egyik esetben sem feltétlenül egyeztethetők össze a sejtek túlélésével.

Ez a vizsgálati módszer egyaránt lehetővé teszi az aktin-polimerizációt gátló citokalazin-B-t (a továbbiakban: citoB) tartalmazó és nélkülöző protokollok használatát. A citoB mitózist megelőző hozzáadása kétmagvú sejteket eredményez, és ennélfogva kizárólag a mitózison átesett sejtek esetében teszi lehetővé a mikronukleuszok azonosítását és analízisét (4) (5). Ez a vizsgálati módszer a citokinezis-gátlást nem alkalmazó protokollok használatát is lehetővé teszi, feltéve, hogy a vizsgált sejtpopuláció mitózisa bizonyítható.

Amellett, hogy MNvit vizsgálat alkalmazható a mikronukleuszokat indukáló vegyi anyagok azonosítására, a kinetokorok immunkémiai jelölése, illetve a centroméra/teloméra-próbák hibridizációja (fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)) arról is további információkat biztosíthat, hogy milyen mechanizmussal történt a kromoszómasérülés és a mikronukleusz-képződés (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Az említett jelölési és a hibridizációs technikákat akkor lehet alkalmazni, ha fokozódik a mikronukleusz-képződés, és a vizsgáló szeretné megállapítani, hogy ez a fokozódás klasztogén és/vagy aneugén hatásra jött-e létre.

Mivel az interfázisos sejtekben lévő mikronukleuszok viszonylag objektív módon vizsgálhatók, a laboratóriumi személyzetnek csak a citoB használata esetén előforduló kétmagvú sejtek számát, valamint a mikronukleált sejtek összes esetbeli előfordulását kell meghatároznia. Ennek következtében a tárgylemezek viszonylag gyorsan értékelhetők, és az elemzés automatizálható. Ez a gyakorlatban kezelésenként több száz helyett több ezer sejt értékelését teszi lehetővé, növelve a vizsgálat erejét. Végül megállapítható, hogy mivel a mikronukleuszok visszamaradó kromoszómákból keletkezhetnek, lehetséges olyan aneuploidiát indukáló anyagok azonosítása, amelyek a kromoszóma-rendellenességek hagyományos vizsgálatával, például e melléklet B.10. fejezete (18) szerint nehezen tanulmányozhatók. Az e vizsgálati módszerben ismertetett MNvit vizsgálat ugyanakkor speciális technikák, például a 4. pontban említett FISH alkalmazása nélkül nem teszi lehetővé a kromoszómaszám változását és/vagy ploidiát okozó és a klasztogén hatású vegyi anyagok megkülönböztetését.

Az MNvit vizsgálat számos különféle sejttípus esetében, valamint citoB jelenlétében és hiányában is megbízhatóan lebonyolítható. Az MNvit vizsgálat hitelességét különböző sejttípusok (sejtvonal-tenyészetek vagy primer sejtkultúrák) alkalmazásával nyert nagy mennyiségű adat támasztja alá (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Ezek közé tartoznak különösen a Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) által koordinált nemzetközi validálási vizsgálatok (19) (20) (21) (22) (23) és a genotoxicitás vizsgálatával foglalkozó nemzetközi műhely (International Workshop on Genotoxicity Testing) jelentései (5) (17). A rendelkezésre álló

▼M7

adatokat az Európai Bizottság Alternatív Módszerek Validálásával Foglalkozó Európai Központja (ECVAM) is újraértékelte egy, az adatok bizonyító erejét mérlegelő retrospektív validálási vizsgálatban, és a vizsgálati módszert az ECVAM tudományos tanácsadó bizottsága (ESAC) tudományosan megalapozott módszerként jóváhagyta (37) (38) (39).

Az emlőssejtek MNvit vizsgálata során emberekből vagy rágcsálókból származó sejtvonal-tenyészetek vagy primer sejtkultúrák alkalmazhatók. Mivel a mikronukleusz-képződés háttérgyakorisága befolyásolja a vizsgálat érzékenységét, ezért stabil és meghatározott mikronukleusz-képződési háttérgyakorisággal rendelkező sejttípusok alkalmazása javasolt. A felhasznált sejteket a tenyészetben való megfelelő növekedési képesség, a kariotípusuk stabilitása (többek között a kromoszómaszám) és a mikronukleuszok spontán gyakorisága alapján kell kiválasztani (40). A rendelkezésre álló adatok jelenleg nem teszik lehetővé határozott ajánlások megfogalmazását, azonban arra utalnak, hogy a kémiai veszélyek értékelése során fontos figyelembe venni a vizsgálat céljára kiválasztott sejtek p53 státuszát, genetikai (kariotípus-) stabilitását, DNS-reparációs képességét és eredetét (rágcsáló-, illetve emberi sejtek). E vizsgálati módszer alkalmazóinak tehát érdemes figyelembe venniük a sejtek szóban forgó és egyéb tulajdonságainak a sejtvonalak teljesítményére kifejtett hatását a mikronukleuszok indukálásának kimutatása során, mivel a tudomány fejlődik ezen a területen.

A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

Az *in vitro* végrehajtott vizsgálatok rendszerint szükségessé teszik a metabolikus aktiválás valamilyen exogén forrásának használatát, kivéve, ha a sejtek metabolizálják a vizsgálati vegyi anyagokat. Az exogén metabolikus aktivációs rendszer nem utánozza teljesen az *in vivo* körülményeket. Ügyelni kell arra, hogy ne álljanak elő olyan körülmények, amelyek a vizsgálati vegyi anyagok genotoxicitását nem tükröző, hamis pozitív eredményekhez vezethetnek. Ilyen körülmény többek között a pH (41) (42) (43) vagy az ozmolalitás változása, a sejttenyésztő közeggel fellépő kölcsönhatás (44) (45) vagy a túlzott mértékű citotoxicitás (lásd a 29. pontot).

A mikronukleuszok indukálásának vizsgálatához elengedhetetlen, hogy a kezelt és a nem kezelt tenyészetekben egyaránt végbemenjen mitózis. A mikronukleuszok értékeléséhez az a szakasz szolgáltatja a legtöbb információt, amelyben a sejt a vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelés során vagy után egy mitózison esett át. A gyártott nanoanyagok esetében e vizsgálati módszer egyedi adaptálására van szükség, amelyet azonban ez a vizsgálati módszer nem ismertet.

A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

A VIZSGÁLAT ELVE

Az emberből vagy más emlősből származó sejttenyészeteket exogén metabolikus aktiválási forrással vagy anélkül is kezelni kell a vizsgálati vegyi anyaggal, kivéve megfelelő metabolizáló képességű sejtek használata esetén (lásd a 19. pontot).

A vizsgálati vegyi anyaggal történt expozíció során vagy után a sejteket elegendő ideig kell tenyészteni ahhoz, hogy kromoszómakárosodás vagy a sejtciklusra/sejtosztódásra kifejtett egyéb hatás jöhessen létre, és ez az interfázisban lévő sejtekben mikronukleuszok képződéséhez vezessen. Az aneuploidia indukálásához a vizsgálati vegyi anyagnak általában jelen kell lennie a mitózis során. A mikronukleuszok jelenlétét a begyűjtött és megfestett, interfázisban lévő sejtekben vizsgálják. Ideális esetben a mikronukleuszokat csak azokban a sejtekben kell megszámolni, amelyek a vizsgálati vegyi anyaggal történt expozíció során vagy – ha van ilyen – a kezelés utáni időszakban estek át mitózison.

▼M7

A citokinezis-gátlóval kezelt tenyészetekben ez könnyen megvalósítható csupán a kétmagvú sejtek értékelésével. Citokinézis-gátló hiányában fontos annak bizonyítása, hogy a vizsgált sejtek – a sejtpopuláció növekedése alapján – valószínűleg sejtosztódáson estek át a vizsgálati vegyi anyaggal történt expozíció során vagy után. Minden protokoll esetében fontos bizonyítani, hogy a sejtproliferáció a kontroll- és a kezelt tenyészetekben egyaránt végbement, és a mikronukleuszok értékeléséhez használt összes tenyészetben meg kell állapítani a vizsgálati vegyi anyag által kiváltott citotoxicitás vagy citosztázis mértékét.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Sejtek

Emberek vagy más emlősök perifériás véréből származó tenyésztett primer limfociták (7) (20) (46) (47) és bizonyos rágcsáló sejtvonalak, például a CHO, V79, CHL/IU és L5178Y sejtek vagy humán sejtvonalak, például TK6 sejtvonal alkalmazhatók (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (lásd a 6. pontot). Eddig egyéb sejtvonalak, például HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2 sejtek (52) (53), A549 és szíriai hörcsögembrióból származó primer sejtek (54) voltak használatosak mikronukleusz-vizsgálathoz, ezúttal azonban nem volt teljes a validálásuk. E sejtvonalak és sejttípusok alkalmazását a vizsgálat során mutatott teljesítményük alapján, az „Elfogadhatósági kritériumok” című részben leírtak szerint kell indokolni. Beszámolók szerint a citoB potenciálisan befolyásolhatja az L5178Y sejtek növekedését, ezért nem ajánlott ezzel a sejtvonallal (23). Primer sejtek használatakor állatjóléti okok miatt meg kell fontolni emberi eredetű sejtek használatát – amennyiben megvalósítható –, és azokból a humán etikai elveknek és a vonatkozó szabályozásoknak megfelelően kell mintát venni.

Az emberi perifériás limfocitákat olyan fiatal (kb. 18–35 éves), nem dohányzó egyénektől kell venni, akik ismert betegséggel nem rendelkeznek, illetve a közelmúltban genotoxikus szereknek (például vegyi anyagoknak, ionizáló sugárzásnak) nem voltak kitéve olyan mértékben, amely fokozná a mikronukleált sejtek háttérbeli előfordulását. Ez biztosítaná, hogy a mikronukleált sejtek háttérbeli előfordulása alacsony és egységes legyen. A mikronukleált sejtek alapesetbeli előfordulása az életkor előrehaladtával nő, és ez a tendencia a nőknél jellemzőbb, mint a férfiaknál (55). Amennyiben több donortól származó sejteket együtt használnak fel, akkor a donorok számát meg kell adni. Igazolni kell, hogy a sejtek a vizsgálati vegyi anyaggal való kezelés kezdetétől a sejtekből történő mintavételig osztódtak. A sejttenyészeteket exponenciális növekedési fázisban (sejtvonalakban) kell tartani vagy osztódásra kell késztetni (primer limfocita-tenyészetek) a sejteknek a sejtciklus különböző szakaszaiban történő expozíciója érdekében, mivel a sejtfázisoknak a vizsgálati vegyi anyagokra való érzékenysége nem feltétlenül lehet ismert. Azok a primer sejtek, amelyeket az osztódás érdekében mitogén szerekkel kell stimulálni, a vizsgálati vegyi anyagnak való expozíció során általában már nem szinkronizáltak (például az emberi limfociták 48 órás mitogén stimulációt követően). Szinkronizált sejtek használata nem javasolt a vizsgálati vegyi anyaggal való kezelés során, indokolt esetben azonban elfogadható.

Tenyészközegek és tenyésztési körülmények

A tenyészetek fenntartására megfelelő tenyészközeget és inkubációs feltételeket (tenyésztőedények, megfelelő esetben 5 %-os CO_2-koncentrációjú párás légkör, 37 °C-os hőmérséklet) kell alkalmazni. A sejtvonalakat rutinszerűen ellenőrizni kell a modális kromoszómaszám stabilitása és a mikoplazma-fertőzés hiánya szempontjából, és a sejtek nem használhatók fel, ha fertőzöttek, vagy ha a modális kromoszómaszám megváltozott. A vizsgálólaboratóriumban használt sejtvonalak, illetve primer sejtkultúrák rendes sejtciklusidejét meg kell állapítani, és annak összhangban kell lennie a közzétett sejtjellemzőkkel.

▼M7

A tenyészetek előkészítése

Sejtvonalak: a sejteket törzstenyészetekből fel kell szaporítani, majd tenyészközegbe kell leoltani olyan sejtszámmal, hogy a sejtek a szuszpenziókban vagy a monolayer tenyészetekben továbbra is exponenciálisan növekedjenek a begyűjtés idejéig (a monolayer tenyészetekben növő sejtek esetében például kerülendő a konfluencia).

Limfociták: alvadásgátlóval (például heparinnal) kezelt teljes vért vagy szeparált limfocitákat kell tenyészteni (például emberi limfociták esetében 48 óráig) mitogén szer [emberi limfociták esetében például phytohaemagglutinin (PHA)] jelenlétében, annak érdekében, hogy a vizsgálati vegyi anyagnak és a citoB-nek való expozíció előtt sejtosztódást váltsanak ki.

Metabolikus aktiválás

Megfelelő endogén metabolikus kapacitással nem rendelkező sejtek használata esetén exogén metabolizáló rendszereket kell alkalmazni. Amennyiben másik rendszer nem indokolt, az alapértelmezetten ajánlott, legáltalánosabban használt rendszer a rágcsálók (általában patkányok) enziminducerrel (ilyen például az Aroclor 1254 (56) (57) vagy fenobarbitál és b-naftoflavon kombinációjával (58) (59) (60)) kezelt májából preparált, kofaktor-kiegészítésű posztmitokondriális frakció (S9). Ez utóbbi kombináció nem ütközik a környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokról szóló stockholmi egyezménnyel (61), és kiderült róla, hogy olyan hatékony, mint az Aroclor 1254 a vegyes funkciójú oxidáz indukálásához (58) (59) (60). Az S9 frakció jellemzően 1–2 térfogatszázalék koncentrációban használatos, de a végső vizsgálati közegben 10 térfogatszázalékra növelhető. A mitotikus indexet csökkentő termékek, különösen a kalcium-komplexáló termékek (62) használata kerülendő a kezelés során. Az alkalmazott exogén metabolikus aktivációs rendszer vagy metabolikus induktor típusának és koncentrációjának megválasztását befolyásolhatja a vizsgált anyagok osztálya.

A vizsgálati vegyi anyag előkészítése

A szilárd halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagokat a sejtek kezelése előtt megfelelő oldószerben elő kell készíteni, és szükség esetén hígítani kell. A folyékony halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagok közvetlenül hozzáadhatók a vizsgálati rendszerhez és/vagy hígíthatók a vizsgálati rendszer kezelése előtt. A gáz halmazállapotú vagy illékony vizsgálati vegyi anyagokat a standard protokollok megfelelő módosításával, például légmentesen lezárt edényekben történő kezeléssel kell vizsgálni (63) (64) (65). A vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó készítményeket pontosan a kezelés előtt kell előállítani, kivéve, ha a stabilitásra vonatkozó adatok a tárolás elfogadhatóságát bizonyítják.

Vizsgálati körülmények

Oldószerek

Az oldószert oly módon kell kiválasztani, hogy optimalizálja a vegyi anyag oldhatóságát, ugyanakkor ne befolyásolja hátrányosan a vizsgálat lebonyolítását, vagyis ne változtassa meg a sejtek növekedését, ne érintse a vizsgálati vegyi anyag integritását, ne lépjen reakcióba a tenyésztőedényekkel, és ne károsítsa a metabolikus aktivációs rendszert. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer (vagy tenyészközeg) használatát érdemes megfontolni. Jól bevált oldószer a víz vagy a dimetil-szulfoxid (DMSO). A szerves oldószerek mennyisége nem haladhatja meg az 1 térfogatszázalékot. CitoB DMSO-ban történő feloldása esetén a vizsgálati vegyi anyaghoz és a citoB-hez felhasznált szerves oldószer teljes mennyisége sem haladhatja meg az 1 térfogatszázalékot; annak biztosítása érdekében, hogy a szerves oldószer százalékos aránya ne fejtsen ki káros hatást, nem kezelt kontrollokat kell használni. A végleges kezelési közegben a vizes oldószerek (sós lé vagy víz) nem haladhatják meg a 10 térfogatszázalékot. Ha jól bevált szerves oldószerektől eltérő oldószereket (például etanolt vagy acetont) használnak, a használatukat a vizsgálati vegyi anyaggal és a vizsgálati rendszerrel való összeegyeztethetőségükre utaló, valamint azt

▼M7

jelző adatokkal kell alátámasztani, hogy a használt koncentrációnál nem genotoxikusak. Alátámasztó adatok hiányában fontos nem kezelt kontrollok (lásd az 1. függeléket), valamint oldószeres kontrollok alkalmazása annak bizonyítására, hogy a kiválasztott oldószer nem vált ki ártalmas vagy kromoszómakárosító hatást (például aneuploidiát vagy klasztogén hatást).

CitoB alkalmazása citokinezis-gátlóként

Az MNvit vizsgálat teljesítményét illetően az egyik legfőbb szempont annak biztosítása, hogy az értékelt sejtek a kezelés során vagy – ha volt ilyen – a kezelés utáni inkubációs periódusban mitózison essenek át. A mikronukleuszok értékelése ezért azokra a sejtekre korlátozandó, amelyek a kezelés során vagy után átestek mitózison. A citokinezis gátlására a legelterjedtebben alkalmazott szer a citoB, mivel gátolja az aktin kapcsolódását, ezzel megakadályozza az utódsejtek mitózis utáni szétválását, ami kétmagvú sejtek képződéséhez vezet (6) (66) (67). A vizsgálati vegyi anyag által a sejtproliferáció kinetikájára gyakorolt hatás citoB használata esetén párhuzamosan mérhető. Humán limfociták alkalmazása esetén a citoB citokinezis-gátlóként alkalmazandó, mivel a sejtciklusidők változóak lesznek a donorok körében, és mivel nem az összes limfocita fog reagálni a PHA-stimulációra. A citoB nem kötelező más sejttípusok esetén, ha megállapítható, hogy sejtosztódáson mentek át, ahogyan a 27. pontban szerepel. A citoB továbbá nem általánosan használatos, ha a mintákat áramlási citometriás módszerekkel értékelik a mikronukleuszok szempontjából.

A citoB megfelelő koncentrációját az egyes sejttípusokra vonatkozóan a laboratóriumnak kell meghatároznia annak érdekében, hogy az oldószeres kontrolltenyészetekben optimális gyakorisággal alakuljanak ki kétmagvú sejtek, továbbá be kell igazolódnia annak, hogy az értékeléshez megfelelő számú kétmagvú sejtet hoz létre. A citoB megfelelő koncentrációja általában 3–6 μg/ml (19).

A sejtproliferáció és a citotoxicitás mérése, valamint a kezelési koncentrációk kiválasztása

A vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációjának meghatározása során kerülendő az olyan koncentráció, amely hamis pozitív válaszreakciókat válthat ki, ilyen a túlzott citotoxicitást okozó koncentráció (lásd a 29. pontot), a tenyészközegben való kicsapódást okozó koncentráció (lásd a 30. pontot), illetve a pH vagy az ozmolalitás jelentős változását okozó koncentráció (lásd az 9. pontot). Ha a vizsgálati vegyi anyag a hozzáadásakor jelentős változást okoz a tenyészközeg pH-jában, a pH a kezelésre szolgáló végleges tenyészközeg pufferelésével kiigazítható, hogy elkerülhetők legyenek a hamis pozitív eredmények és megfelelő tenyésztési feltételeket lehessen fenntartani.

Mérni kell a sejtproliferációt annak biztosítása érdekében, hogy a vizsgálat során elegendő kezelt sejt átessen a mitózison, és hogy a kezelésekre megfelelő szintű citotoxicitás mellett kerüljön sor (lásd a 29. pontot). A citotoxicitást a fő kísérletben metabolikus aktiválással és anélkül is kell meghatározni a sejtelhalás és a sejtnövekedés megfelelő mutatóinak használatával (lásd a 26. és a 27. pontot). Bár egy kiindulási előzetes vizsgálat során hasznos lehet a citotoxicitás értékelése a fő kísérletben alkalmazandó koncentrációk jobb meghatározásához, a kiindulási vizsgálat nem kötelező. Végrehajtása esetén nem helyettesítheti a citotoxicitás fő kísérlet során történő mérését.

A tenyészetek citoB-vel történő kezelése, valamint a tenyészetben található egymagvú, kétmagvú és többmagvú sejtek relatív gyakoriságainak mérése pontos módszer a kezelés sejtproliferációt előidéző és citotoxikus vagy citosztatikus hatásának mennyiségi meghatározására (6), valamint biztosítja, hogy csak a kezelés során vagy után osztódott sejtek kerüljenek értékelésre. A tenyészetenként legalább 500 sejtből számított citokinezis-gátlási proliferációs index (CBPI)

▼M7

(6) (27) (68) vagy replikációs index (RI) (a képletekért lásd a 2. függeléket) ajánlott egy-egy kezelés citotoxikus vagy citosztatikus aktivitásának a kezelt és a kontrolltenyészetekben kapott értékek összevetésével történő becsléséhez. A citotoxicitás egyéb mutatóinak (például a sejtek egybefüggősége, apoptózis, nekrózis, metafázis-számolás, sejtciklus) értékelése hasznos információval szolgálhat, de azokat a CBPI vagy az RI helyett kell használni.

A citoB nélkül végzett vizsgálatokban igazolni kell, hogy a tenyészeten belüli sejtek osztódtak, annak érdekében, hogy a vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelés alatt vagy az után az értékelt sejtek jelentős hányada átessen az osztódáson, ellenkező esetben hamis negatív válaszreakciók alakulhatnak ki. Egy-egy kezelés citotoxikus és citosztatikus aktivitásának becslésére (17) (68) (69) (70) (71) a relatív populációduplázódásnak (RPD) vagy a sejtszám relatív növekedésének (RICC) a mérése ajánlott (a képletekért lásd a 2. függeléket). Meghosszabbított mintavételi idők esetén (például 1,5–2 normál sejtciklusideig tartó kezelés és további 1,5–2 normál sejtciklusidő eltelte utáni begyűjtés, ami összesen a 38. és 39. pontban foglalt 3–4 normál sejtciklusidőnél hosszabb mintavételi időket eredményez) az RPD alulbecsülheti a citotoxicitást (71). Ilyen körülmények között az RICC jobb mértékegység lehet, illetve a citotoxicitás 1,5–2 normál sejtciklusidő utáni értékelése hasznos becslés lehet. A citotoxicitás, illetve a citosztázis egyéb markereinek (például a sejtek egybefüggősége, apoptózis, nekrózis, metafázis-számolás, proliferációs index (PI), sejtciklus, nukleoplazmikus hidak vagy sejtmag-kidudorodások) értékelése további hasznos információkkal szolgálhat, azonban nem alkalmazható sem az RPD, sem az RICC helyett.

Az elfogadhatósági kritériumokat (megfelelő citotoxicitás, sejtszám stb.) teljesítő, (az oldószeres és a pozitív kontrollokat nem tartalmazó) legalább három vizsgálati koncentrációt kell értékelni. A sejtek típusától (limfocita-sejtvonalak vagy primer limfocita-tenyészetek) függetlenül, minden egyes vizsgált koncentrációnál párhuzamos vagy szimpla kezelt tenyészetek használhatók. Bár két párhuzamos tenyészet használata ajánlatos, a szimpla tenyészetek is elfogadhatóak, amennyiben a szimpla vagy a párhuzamos tenyészetek esetében megegyezik az összességében értékelt sejtek száma. A szimpla tenyészetek használata különösen releváns, ha több mint három koncentráció értékelésére kerül sor (lásd a 44–45. pontot). A független párhuzamos tenyészetekből adott koncentráció mellett kapott eredmények összevonhatók az adatelemzéshez. Az alacsony citotoxicitást vagy a citotoxicitás hiányát mutató vizsgálati vegyi anyagok esetében rendszerint megközelítőleg kétszeres-háromszoros koncentrációs intervallumok helyénvalóak. Citotoxicitás fellépése esetén a vizsgálati koncentrációknak le kell fedniük a 29. pontban ismertetett, citotoxicitást okozó koncentrációtól azokig a koncentrációkig terjedő tartományt, ahol mérsékelt vagy alacsony a citotoxicitás, illetve nem jelentkezik citotoxicitás. Számos vizsgálati vegyi anyagnak meredek a koncentráció-válasz görbéje, és annak érdekében, hogy alacsony és mérsékelt citotoxicitásnál adatokat lehessen nyerni, vagy részletesen meg lehessen vizsgálni a dózis-válasz összefüggést, egymáshoz közelebbi koncentrációkat és/vagy háromnál több koncentrációt (szimpla tenyészeteket vagy párhuzamos tenyészeteket) kell használni, különösen olyan helyzetekben, ahol megismételt kísérlet szükséges (lásd a 60. pontot).

Ha a legmagasabb koncentráció a citotoxicitáson alapul, a legmagasabb koncentrációval 55 ± 5 %-os citotoxicitást kell megcélozni a citotoxicitás ajánlott paramétereinek alkalmazásával (azaz citoB használatának hiányában a sejtvonalak RICC és RPD mutatójának, illetve citoB használata esetén a CBPI vagy RI mutatónak a párhuzamos negatív kontroll 45± 5 %-ára csökkentésével) (72). Az 55 ± 5 %-os citotoxicitási tartománynak csak a magasabb részén megtalálható pozitív eredmények értelmezése során körültekintően kell eljárni (71).

▼M7

A legalacsonyabb oldhatatlan koncentrációnál alacsonyabb koncentrációk mellett nem citotoxikus, kevéssé oldható vegyi anyagok esetében a legmagasabb analizált koncentrációnak a vizsgálati vegyi anyaggal történő kezelés végén szemmel vagy inverz mikroszkóp segítségével látható zavarosságot vagy kicsapódást kell okoznia. Még abban az esetben is, ha citotoxicitás a legalacsonyabb oldhatatlan koncentráció felett jön létre, ajánlatos egyetlen egy, zavarosságot vagy látható kicsapódást okozó koncentrációt vizsgálni, mivel a kicsapódás álhatásokat eredményezhet. A kicsapódást okozó koncentrációnál ügyelni kell annak biztosítására, hogy a kicsapódás ne zavarja a vizsgálat lebonyolítását (például a megfestést vagy az értékelést). Hasznos lehet a tenyészközegben való oldhatóság meghatározása a kísérlet előtt.

Ha nem figyelhető meg kicsapódás vagy korlátozó citotoxicitás, a legmagasabb vizsgálati koncentrációnak 10 mM-nek, 2 mg/ml-nek vagy 2 μ/ml-nek kell megfelelnie, melyek közül a legalacsonyabb a mérvadó (73) (74) (75). Ha a vizsgálati vegyi anyag nem meghatározott összetételű, például ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyag (UVCB) (76), környezeti extraktum stb., előfordulhat, hogy kellő citotoxicitás hiányában a legmagasabb koncentrációnak magasabbnak (például 5 mg/ml-nek) kell lennie ahhoz, hogy növekedjen az egyes összetevők koncentrációja. Megjegyzendő azonban, hogy ezek a követelmények eltérőek lehetnek a humán gyógyszerek esetében (93).

Kontrollok

Minden begyűjtés alkalmával párhuzamos negatív kontrollokat kell használni (lásd a 21. pontot), amelyeknél csak oldószert alkalmaznak a kezelt közegben, és a feldolgozásuk ugyanolyan módon történik, mint a kezelt tenyészeteké.

Párhuzamos pozitív kontrollok szükségesek annak igazolására, hogy a laboratórium képes az alkalmazott vizsgálati protokoll feltételei mellett klasztogének és aneugének azonosítására, valamint adott esetben az exogén metabolikus aktivációs rendszer eredményességének igazolása érdekében. Pozitív kontrollokra vonatkozó példák az alábbi 1. táblázatban találhatók. Indokolt esetben pozitív kontrollként alternatív vegyi anyagok használhatók.

Jelenleg nem ismert olyan aneugén hatású anyag, amely genotoxikus aktivitásához metabolikus aktiválást igényelne (17). Mivel az emlőssejtek genetikai toxicitás szempontjából végzett *in vitro* vizsgálatai a metabolikus aktiválással és anélkül, ugyanannyi ideig egyidejűleg végzett rövid távú kezelések esetében kellően szabványosítottak, a pozitív kontrollok használata a metabolikus aktiválást igénylő klasztogénekre korlátozódhat. Ebben az esetben egyetlen klasztogén pozitív kontroll válaszreakciója a metabolikus aktivációs rendszer aktivitását és a vizsgálati rendszer reagálóképességét is bizonyítani fogja. A(z S9 nélküli) hosszú távú kezelésnek azonban kell, hogy legyen saját pozitív kontrollja, mivel a kezelés időtartama eltér a metabolikus aktiválás alkalmazása mellett végzett vizsgálatétól. Ha metabolikus aktiválással és anélkül végzett rövid távú kezeléshez klasztogént választanak ki egyetlen pozitív kontrollként, a metabolikus aktiválás nélküli hosszú távú kezeléshez aneugént kell kiválasztani. Az S9 preparátumot nem igénylő, metabolikusan megfelelő sejtekben a klasztogén és az aneugén hatás vizsgálatához egyaránt szükséges pozitív kontrollt alkalmazni.

Mindegyik pozitív kontrollt egy vagy több olyan koncentrációban kell alkalmazni, amely a háttérértékekben reprodukálható és kimutatható növekedést okoz, hogy bizonyítani lehessen a vizsgálati rendszer érzékenységét (azaz a hatások egyértelműek, de értékelést végző személy nem tudja beazonosítani azonnal a kódolt tárgylemezt), és a választ nem veszélyeztetheti a vizsgálati módszerben meghatározott határértékeket meghaladó citotoxicitás.

▼M7

1. táblázat

A laboratóriumok jártasságának értékeléséhez és a pozitív kontrollok kiválasztásához ajánlott referenciaanyagok

Kategória	Vegyi anyag	CASRN
1. **Metabolikus aktiválás nélkül is aktív klasztogének**		
	Metil-metánszulfonát	66-27-3
	Mitomicin-C	50-07-7
	4-Nitro-kinolin-N-oxid	56-57-5
	Citozin-arabinozid	147-94-4
2. **Metabolikus aktiválást igénylő klasztogének**		
	Benzo(a)pirén	50-32-8
	Ciklofoszfamid	50-18-0
3. **Aneugén anyagok**		
	Kolchicin	64-86-8
	Vinblasztin	143-67-9

ELJÁRÁS

A kezelés ütemterve

A sejtciklus meghatározott fázisában ható aneugén, illetve klasztogén anyagok azonosítási valószínűségének maximalizálása érdekében fontos, hogy a sejtek összes különböző ciklusát képviselő elegendő számú sejt kezelésére kerüljön sor a vizsgálati vegyi anyaggal. Minden kezelésnek a sejtek exponenciális növekedése alatt kell kezdődnie és befejeződnie, és a sejteknek a mintavétel időpontjáig tovább kell növekedniük. A kezelés ütemterve a sejtvonalak és primer sejtkultúrák esetében ezért valamelyest eltérhet a limfocitákétól, amelyek mitogén stimulációt igényelnek ahhoz, hogy megkezdődjön a sejtciklusuk (17). Limfociták esetében a leghatékonyabb módszer, ha a vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelés a PHA-stimuláció után 44–48 órával kezdődik, amikorra a sejtek aszinkron módon fognak osztódni (6).

A közzétett adatokból (19) az derül ki, hogy a legtöbb aneugén és klasztogén anyag kimutatása rövid, 3–6 órás kezelési időszak alkalmazásával – S9 jelenlétében vagy hiányában – történik, amelyet a vizsgálati vegyi anyag eltávolítása, majd – a kezelés megkezdése után kb. 1,5–2,0 normál sejtciklusidőnek megfelelő időpontban történő –mintavétel követ (7).

A negatív eredmény megállapításához szükséges alapos értékeléshez ugyanakkor mindhárom alábbi kísérleti körülményt meg kell teremteni, metabolikus aktiválással és anélkül végzett rövid távú kezeléssel, valamint metabolikus aktiválás nélküli hosszú távú kezeléssel (lásd az 56., 57. és 58. pontot):

— a sejteket metabolikus aktiválás nélkül 3–6 órára ki kell tenni a vizsgálati vegyi anyag hatásának, és azokból a kezelés megkezdése után kb. 1,5–2,0 normál sejtciklusidőnek megfelelő időpontban mintát kell venni (19),

— a sejteket metabolikus aktiválással 3–6 órára ki kell tenni a vizsgálati vegyi anyag hatásának, és azokból a kezelés megkezdése után kb. 1,5–2,0 normál sejtciklusidőnek megfelelő időpontban mintát kell venni (19),

▼M7

— a sejteket a kezelés megkezdése után kb. 1,5–2,0 normál sejtciklusidőnek megfelelő időpontban történő mintavételig metabolikus aktiválás nélkül folyamatosan ki kell tenni a vizsgálati vegyi anyagnak.

Abban az esetben, ha a fenti kísérleti körülmények pozitív válaszreakciót eredményeznek, a többi kezelési eljárás vizsgálata nem feltétlenül szükséges.

Amennyiben ismert vagy feltehető, hogy a vizsgálati vegyi anyag befolyásolja a sejtciklusidőt (például nukleozidanalógok vizsgálatakor), különösen a p53 státusz meghatározására alkalmas sejtek esetében (35) (36) (77), a mintavételi vagy visszanyerési idők legfeljebb további 1,5–2,0 normál sejtciklusidővel (azaz a rövid távú és a hosszú távú kezelés megkezdése után összesen 3,0–4,0 sejtciklusidőre) meghosszabbíthatók. Ezeknek a választási lehetőségeknek azokban a helyzetekben van jelentőségük, amikor problémát jelenthet a vizsgálati vegyi anyag és a citoB lehetséges kölcsönhatása. Meghosszabbított mintavételi idők (azaz összesen 3,0–4,0 sejtciklusidőnyi tenyésztési idő) alkalmazásakor ügyelni kell annak biztosítására, hogy a sejtek még mindig aktívan osztódjanak. Limfociták esetében például az exponenciális növekedés a stimuláció utáni 96 óra elteltével csökkenhet és a sejtek monolayer tenyészetei konfluenssé válhatnak.

A sejtek kezelésének javasolt ütemtervét az 2. táblázat foglalja össze. Ezek az általános kezelési ütemtervek a vizsgálati vegyi anyag stabilitásától és reaktivitásától, illetve az alkalmazott sejtek konkrét szaporodási jellemzőitől függően módosíthatóak (és indokolandóak).

2. táblázat

A sejtek kezelésének és begyűjtésének ideje az MNvit vizsgálat esetében

CitoB-vel kezelt limfociták, primer sejtek és sejtvonalak	+ S9 Rövid kezelés	A sejteket 3–6 órán át S9 jelenlétében kell kezelni; el kell távolítani az S9-et és a kezelési közeget; friss közeget és citoB-t kell hozzáadni; a kezelés megkezdése után 1,5–2,0 normál sejtciklusidő elteltével kell begyűjteni.
	– S9 Rövid kezelés	A sejteket 3–6 órán át kell kezelni; el kell távolítani a kezelési közeget; friss közeget és citoB-t kell hozzáadni; a kezelés megkezdése után 1,5–2,0 normál sejtciklusidő elteltével kell begyűjteni.
	– S9 Meghosszabbított kezelés	A sejteket 1,5–2,0 normál sejtciklusidőnek megfelelő ideig citoB jelenlétében kell kezelni; a kezelési időszak végén be kell gyűjteni a sejteket.
CitoB nélkül kezelt sejtvonalak (Megegyezik a fentebb ismertetett kezelési ütemtervvel, azzal a kivétellel, hogy citoB hozzáadására nem kerül sor)		

A monolayer tenyészetekben a 3–6 órás kezelés végén mitotikus sejtek (ismertetőjegyük, hogy alakjuk kerek, és leválnak a felszínről) lehetnek jelen. Mivel ezek a mitotikus sejtek könnyen leválnak, a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó közeg eltávolításakor elveszhetnek. Ha bizonyíték van arra, hogy a mitotikus sejtek száma a kontrollokéhoz képest jelentősen megnő, valószínűsíthető mitotikus leállást jelezve, a sejteket centrifugálással be kell gyűjteni és vissza kell tenni a tenyészetbe, annak elkerülése érdekében, hogy a begyűjtéskor elvesszenek a mitózisban lévő sejtek, valamint azok a sejtek, amelyeknél mikronukleuszok/kromoszóma-rendellenesség kockázata áll fenn.

▼M7

A sejtek begyűjtése és a tárgylemez preparálása

A begyűjtést és a feldolgozást minden tenyészetnél külön kell végezni. A sejtek előkészítéséhez hozzátartozhat a hipotóniás kezelés, ez a lépés azonban nem szükséges, ha a sejtek megfelelő szétterítése egyéb módon is elérhető. A tárgylemez preparálása során különböző technikák alkalmazhatók, amennyiben ezek az értékeléshez jó minőségű sejtpreparátumokat eredményeznek. Az érintetlen sejtmembránú és citoplazmájú sejteket meg kell tartani, hogy ki lehessen mutatni a mikronukleuszokat és (a citokinezis-gátlási módszer esetén) megbízhatóan azonosítani lehessen a kétmagvú sejteket.

A tárgylemezek különböző módszerekkel festhetők meg, például Giemsa vagy fluoreszkáló DNS-specifikus festékekkel. A megfelelő fluoreszcens festékek (például akridinnarancs (78) vagy Hoechst 33258 plusz pironin-Y (79)) használata kiküszöbölhet néhányat a DNS-re nem jellemző festőanyag használatával mesterségesen előidézett változás közül. A mikronukleuszok tartalmának azonosítására kinetokor elleni antitestek, FISH módszerrel végzett pancentromérás DNS-próbák vagy pancentromer-specifikus primerekkel végzett *in situ* jelölés megfelelő DNS-kontrasztfestéssel alkalmazható (az egész kromoszómák megfestődnek, míg az acentrikus kromoszómatöredékek nem), amennyiben a mikronukleuszok keletkezésének mechanizmusára vonatkozó információkra van szükség (16)(17). A klasztogén és aneugén hatású anyagok megkülönböztetésére egyéb, korábban hatékonynak bizonyult és validált módszerek is alkalmazhatók. Egyes sejtvonalak esetében például a szub-2N sejtmagok képelemzéshez, lézerszkenneléses citometriához vagy áramlási citometriához hasonló eljárásokkal hipodiploid eseményekként történő mérése szintén szolgáltathat hasznos információt (80) (81) (82). A sejtmagok morfológiai megfigyelései ugyancsak utalhatnak lehetséges aneuploidiára. Ezenfelül a metafázisban lévő sejtek kromoszóma-rendellenességeinek lehetőleg ugyanazon sejttípuson és hasonló érzékenységű protokollal történő vizsgálata is hasznos lehet annak meghatározásához, hogy a mikronukleuszok kromoszómatörésnek tudhatók-e be (annak ismeretében, hogy a kromoszómaveszteség kimutatására nem kerülne sor a kromoszóma-rendellenességek vizsgálata során).

Elemzés

A mikronukleuszok gyakoriságának vizsgálatára irányuló mikroszkópos elemzés előtt minden tárgylemezt, az oldószeres és a nem kezelt (ha használnak ilyeneket), valamint a pozitív kontrollokét is ideértve, önálló kódolással kell ellátni. Megfelelő eljárásokat kell alkalmazni az automatizált értékelési rendszer, például áramlási citometria, lézerszkenneléses citometria vagy képelemzés alkalmazásakor esetlegesen felmerülő elfogultság vagy részrehajlás szabályozása érdekében. Függetlenül attól, hogy milyen automatizált platform használatos a mikronukleuszok számolására, a CBPI, az RI, az RPD, illetve az RICC mutatót egyidejűleg vizsgálni kell.

A citoB-vel kezelt tenyészetekben a mikronukleuszok gyakoriságát koncentrációnként és kontrollonként legalább 2 000 kétmagvú sejtben elemezni kell (83), amelyeknek párhuzamosok alkalmazása esetén egyenlően kell megoszlaniuk a párhuzamosok között. Dózisonként egy tenyészet esetén (lásd a 28. pontot) tenyészetenként legalább 2 000 kétmagvú sejtet (83) kell értékelni ebben az egy tenyészetben. Ha (párhuzamos tenyészetek esetén) az egyes koncentrációkban tenyészetenként 1 000-nél vagy (egy tenyészet alkalmazása esetén) 2 000-nél jelentősen kevesebb kétmagvú sejt áll rendelkezésre értékelés céljára, és nem mutatható ki a mikronukleuszok számának jelentős növekedése, akkor vizsgálatot adott esetben több sejt vagy kevésbé citotoxikus koncentrációk alkalmazásával meg kell ismételni. Ügyelni kell arra, hogy ne kerüljenek értékelésre olyan kétmagvú sejtek, amelyek szabálytalan alakúak vagy amelyeknél a két mag mérete jelentősen eltér. Ezen túlmenően a kétmagvú sejtek nem tévesztendők össze a rosszul szétterített többmagvú sejtekkel. A kettőnél több fő magot tartalmazó sejteknél nem szabad vizsgálni a mikronukleuszokat, mivel ezekben a sejtekben magasabb lehet a mikronukleusz-képződés háttérgyakorisága (84). Egymagvú sejtek értékelése elfogadható, amennyiben a vizsgálati vegyi anyagról bebizonyosodott, hogy interferál a citoB aktivitásával. Ilyen esetekben a citoB

▼M7

nélkül megismételt vizsgálat hasznos lehet. A kétmagvú sejtek mellett az egymagvú sejtek értékelése hasznos információval szolgálhat (85) (86), de nem kötelező.

A citoB-vel végzett kezelés nélkül vizsgált sejtvonalakban vizsgálati koncentrációnként és kontrollonként legalább 2 000 sejtben (83) kell értékelni a mikronukleuszokat, amely sejteknek párhuzamosok alkalmazása esetén egyenlően kell megoszlaniuk a párhuzamosok között. Koncentrációnként egy tenyészet alkalmazása esetén (lásd a 28. pontot) legalább 2 000 sejtet kell értékelni ebben az egy tenyészetben. Ha (párhuzamos tenyészetek esetén) az egyes koncentrációkban tenyészetenként 1 000-nél vagy (egy tenyészet alkalmazása esetén) 2 000-nél jelentősen kevesebb sejt áll rendelkezésre értékelés céljára, és nem mutatható ki a mikronukleuszok számának jelentős növekedése, akkor vizsgálatot adott esetben több sejt vagy kevésbé citotoxikus koncentrációk alkalmazásával meg kell ismételni.

CitoB alkalmazása esetén a sejtproliferáció értékelése érdekében tenyészetenként legalább 500 sejtből meg kell határozni a CBPI-t vagy az RI-t (lásd a 2. függeléket). Amennyiben a kezeléseket citoB hiányában végzik, a 24–28. pontban foglaltaknak megfelelően elengedhetetlen annak bizonyítása, hogy a tenyészetben lévő sejtek osztódtak.

A laboratórium jártassága

A laboratóriumoknak a vizsgálat rutinszerű alkalmazása előtti elegendő tapasztalat igazolása érdekében kísérletsorozatot kell végrehajtaniuk referenciaként szolgáló, más-más mechanizmusú pozitív vegyi anyagokkal (legalább egy metabolikus aktiválással és legalább egy metabolikus aktiválás nélkül ható, valamint egy aneugén mechanizmus útján ható, az 1. táblázatban felsoroltak közül kiválasztott vegyi anyaggal), és különféle negatív kontrollokkal (többek között nem kezelt tenyészetek és különböző oldószerek/vivőanyagok). E pozitív és negatív kontrollok válaszreakcióinak összhangban kell lenniük a szakirodalommal. Ez nem vonatkozik azokra a laboratóriumokra, amelyek tapasztalattal rendelkeznek, azaz amelyeknek a rendelkezésére áll a 49–52. pontban meghatározott történeti adatbázis.

A pozitív kontrollként szolgáló, kiválasztott vegyi anyagokat (lásd az 1. táblázatot) metabolikus aktiválás nélkül végzett rövid és hosszú kezeléssel, továbbá metabolikus aktiválás jelenlétében végzett rövid kezeléssel is meg kell vizsgálni a laboratórium klasztogén és aneugén hatású vegyi anyagok kimutatásában való jártasságának bizonyítása, a metabolikus aktivációs rendszer eredményességének meghatározása, valamint az értékelési eljárások (mikroszkóppal végzett vizuális elemzés, áramlási citometria, lézerszkenneléses citometria vagy képelemzés) megfelelőségének bizonyítása érdekében. A vizsgálati rendszer érzékenységének és dinamikus tartományának bizonyítása érdekében a kiválasztott vegyi anyagok koncentrációtartományát úgy kell megválasztani, hogy reprodukálható és koncentrációval összefüggő növekedést biztosítson a háttérértékekhez viszonyítva.

Történeti kontrolladatok

A laboratóriumnak meg kell állapítania a következőket:

— a pozitív kontrollok történeti tartománya és eloszlása,

— a negatív (nem kezelt, oldószeres) kontrollok történeti tartománya és eloszlása.

A negatív kontrollok történeti eloszlásához kapcsolódó első adatgyűjtés során a párhuzamos negatív kontrolloknak összhangban kell lenniük a negatív kontrollokra vonatkozóan közzétett adatokkal, amennyiben léteznek. Amint több kísérleti adat adódik a kontrollok eloszlásához, a párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben az eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük (87) (88). A laboratórium negatív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisát első lépésként legalább 10 kísérlettel kell kiépíteni, de az adatbázisnak lehetőség szerint legalább 20, összehasonlítható kísérleti körülmények között végzett kísérletet kell tartalmaznia. A laboratóriumoknak minőségellenőrzési módszereket, például ellenőrzési diagramokat (C-diagramokat vagy X-bar diagramokat (88))

▼M7

kell alkalmazniuk annak meghatározására, hogy a pozitív és a negatív kontrollokra vonatkozó adataik mennyire változóak, valamint annak bizonyítására, hogy náluk a módszertan „ellenőrzés alatt” áll (83). A történeti adatok összeállításának és felhasználásának módjára (azaz az adatok történeti adatokhoz számításának és azok közül való kizárásának kritériumaira, valamint egy adott kísérlet elfogadhatósági kritériumaira) vonatkozó további ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (87).

A kísérleti protokoll bármely módosítását meg kell vizsgálni abból a szempontból, hogy az adatok összhangban vannak-e a laboratórium meglévő történeti kontrolladatbázisaival. Jelentősebb következetlenségek fennállása esetén új történeti kontrolladatbázist kell létrehozni.

A negatív kontrollokra vonatkozó adatok az egy tenyészetből vagy párhuzamos tenyészetek összességéből származó mikronukleált sejtek előfordulását mutatják, ahogyan az a 28. pontban szerepel. A párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben a laboratórium negatív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisa szerinti eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük (87) (88). Amennyiben a párhuzamos negatív kontrollokra vonatkozó adatok a 95 %-os ellenőrzési határértéken kívül esnek, akkor számíthatók be a kontrollok történeti eloszlásába, amennyiben ezek az adatok nem szélsőségesen kiugró értékek, továbbá bizonyíték van arra, hogy a vizsgálati rendszer „ellenőrzés alatt áll” (lásd az 50. pontot), valamint arra, hogy nem áll fenn szakmai vagy emberi mulasztás.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények ismertetése

A citokinezis-gátlási módszer alkalmazása esetén a mikronuleusz-képződés indukciójának értékelése során (a mikronukleuszok sejtenkénti számától függetlenül) csak a mikronukleuszokkal rendelkező kétmagvú sejtek gyakoriságát kell felhasználni. Az egy, két vagy több mikronukleusszal rendelkező sejtek értékelése külön-külön jelentésbe foglalható és hasznos információval szolgálhat, de nem kötelező.

Egyidejűleg az összes kezelt tenyészet, negatív és pozitív kontrolltenyészet esetében el kell végezni a citotoxicitás és/vagy a citosztázis méréseit (16). A citokinezis-gátlási módszer alkalmazása esetén a kezelt és kontrolltenyészetek esetében a sejtciklus késésének mutatójaként ki kell számolni a CBPI-t vagy az RI-t. CitoB nélkül végzett vizsgálatoknál az RPD-t vagy az RICC-t kell alkalmazni (lásd a 2. függeléket).

Az egyes tenyészetekhez tartozó adatokat meg kell adni. Ezenkívül minden adatot táblázat formájában kell összefoglalni.

Elfogadhatósági kritériumok

Egy-egy vizsgálat elfogadása az alábbi kritériumokon alapul:

— A párhuzamos negatív kontroll az 50. pont szerint belefoglalható a laboratórium negatív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisába.

— A párhuzamos pozitív kontrolloknak (lásd az 50. pontot) a laboratórium pozitív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisában generált válaszokkal összeegyeztethető válaszokat, valamint a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva statisztikailag szignifikáns növekedést kell előidézniük.

— Az oldószeres kontrollban teljesülniük kell a sejtproliferáció kritériumainak (25-27. pont).

— Valamennyi kísérleti körülmény vizsgálatára sor került, kivéve, ha az egyik pozitív eredményeket hozott (36–40. pont).

— Megfelelő számú sejt és koncentráció elemezhető (28. és 44–46. pont).

▼M7

— A legmagasabb koncentráció kiválasztására vonatkozó kritériumok összhangban vannak a 24–31. pontban ismertetett legmagasabb koncentrációkkal.

Az eredmények értékelése és értelmezése

Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha a vizsgált kísérleti körülmények bármelyikében (lásd a 36–39. pontot):

— legalább az egyik vizsgálati koncentráció statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva (89),

— a megfelelő trendpróbával történő értékelés arra utal, hogy a növekedés legalább egy kísérleti körülménynél a dózissal összefügg (lásd a 28. pontot),

— az eredmények bármelyike a történeti negatív kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértékeken; lásd az 52. pontot) kívül esik.

Mindezen kritériumok teljesülése esetén úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag ebben a vizsgálati rendszerben kromoszómatöréseket és/vagy szám feletti kromoszómákat vagy kromoszómaveszteséget képes előidézni. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások a szakirodalomban is megtalálhatók (90) (91) (92).

Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha valamennyi vizsgált kísérleti körülmény mellett (lásd a 36–39. pontot):

— a vizsgálati koncentrációk egyike sem mutat statisztikailag szignifikáns növekedést a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,

— a megfelelő trendpróbával végzett értékelés nem mutat koncentrációval összefüggő növekedést,

— valamennyi eredmény a történeti negatív kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértékeken; lásd az 52. pontot) belül van.

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag ebben a vizsgálati rendszerben nem képes kromoszómatöréseket és/vagy szám feletti kromoszómákat vagy kromoszómaveszteséget előidézni. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások a szakirodalomban is megtalálhatók (90) (91) (92).

Az egyértelműen pozitív vagy egyértelműen negatív válasz igazolása nem követelmény.

Amennyiben a reakció nem egyértelműen negatív és nem is egyértelműen pozitív, ahogyan az a fentiekben szerepel, illetve egy adott eredmény biológiai relevanciája megállapításának segítése érdekében az adatokat szakértői véleménnyel és/vagy további vizsgálatokkal kell értékelni. Hasznos lehet további sejtek értékelése (adott esetben) vagy megismételt kísérlet lehetőleg módosított kísérleti körülmények (például a koncentrációk távolsága, más [S9-es koncentráció vagy S9 eredetű] metabolikus aktiválási feltételek) melletti elvégzése.

Ritka esetekben, még további vizsgálatok után is, az adatkészlet nem teszi lehetővé a pozitív vagy negatív reakcióra vonatkozó következtetést, ezért kétértelmű reakció lesz a következtetés.

Az MNvit vizsgálatban a mikronukleusz-képződést indukáló vizsgálati vegyi anyagok azért válthatnak ki ilyen hatást, mert kromoszómatörést, kromoszómaveszteséget vagy a kettő együttesét idézik elő. Annak vizsgálatára, hogy a mikronukleusz-képződés indukciója klasztogén és/vagy aneugén hatás eredménye-e, kinetokor elleni antitestekkel, centroméraspecifikus *in situ* próbákkal vagy egyéb módszerekkel végzett további elemzések alkalmazhatók.

▼M7

Vizsgálati jegyzőkönyv

A Vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

— eredet, tételszám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag reaktivitása az oldószerrel/vivőanyaggal vagy a sejttenyészethez alkalmazott tenyészközegekkel;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;

— adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tenyészközegben, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-név, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonossága stb.

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai jellemzik.

Oldószer:

— az oldószer kiválasztásának indoklása;

— az oldószernek a végleges tenyészközegen belüli aránya.

Sejtek:

— az alkalmazott sejtek típusa és eredete,

— az alkalmazott sejttípus alkalmassága,

— sejtvonalak esetében a mikoplazma hiánya;

— sejtvonalak esetében a sejtciklus hosszúságára vagy a proliferációs indexre vonatkozó információk;

— limfociták használata esetén a vérdonorok ivara, életkora, valamint a donorra, a teljes vérre vagy az elkülönített limfocitákra, a használt mitogénre vonatkozó bármely releváns információ;

— a normál (negatív kontroll) sejtciklusidő,

— sejtvonalak esetében a passzálások száma, ha rendelkezésre áll;

— sejtvonalak esetében a sejttenyészetek fenntartásának módszerei;

— sejtvonalak esetében a modális kromoszómaszám.

▼**M7**

Vizsgálati körülmények:

— amennyiben alkalmaznak citokinezis-gátló anyagot, annak megnevezése (például citoB), illetve koncentrációja és a sejtek expozíciójának időtartama;

— a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja a tenyészközegen belüli végleges koncentrációjaként kifejezve (például μg, mg/a tenyészközeg mL-e vagy mM-ja);

— a koncentrációk kiválasztásának és a tenyészetek számának indoklása, beleértve a citotoxicitási adatokat és az oldhatóságra vonatkozó korlátokat;

— a közeg összetétele, CO_2-koncentráció, amennyiben alkalmazandó, nedvességtartalom;

— a tenyészközeghez adott oldószer és vizsgálati vegyi anyag koncentrációja (és/vagy térfogata);

— inkubációs hőmérséklet és idő;

— a kezelés időtartama;

— a kezelés utáni begyűjtés időpontja;

— adott esetben a sejtszám a leoltáskor;

— a metabolikus aktivációs rendszer típusa és összetétele (az S9 eredete, az S9 keverék elkészítési módszerei, az S9 keverék koncentrációja vagy térfogata és az S9 a végleges tenyészközegben, az S9 minőségellenőrzése, például az enzimaktivitásra, a sterilitásra, a metabolikus képességre kiterjedően);

— pozitív és negatív kontrollként szolgáló vegyi anyagok, végleges koncentrációk, a kezelés körülményei és időtartama, valamint a visszanyerési idők;

— az alkalmazott tárgylemez-preparálási módszer és festési technika;

— a mikronukleált sejtek értékelésének kritériumai (az elemezhető sejtek kiválasztása és a mikronukleusz azonosítása);

— a vizsgált sejtek száma;

— a citotoxicitás mérésére alkalmazott módszerek;

— a citotoxicitás és az alkalmazott módszer szempontjából lényeges kiegészítő információk;

— a pozitív, negatív és kétes vizsgálati eredmény kritériumai;

— az alkalmazott statisztikai elemzési módszer(ek);

— adott esetben annak meghatározására alkalmazott módszerek (például kinetokor elleni antitest vagy pancentromérás próbák), hogy a mikronukleuszok teljes kromoszómákat vagy csak kromoszómatöredékeket tartalmaznak;

— a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás meghatározására alkalmazott módszerek.

Eredmények:

— az elemzéshez elfogadható sejtek meghatározása;

— citoB hiányában, sejtvonalaknál az egyes tenyészetek esetében kezelt sejtek száma és begyűjtött sejtek száma;

▼M7

— a citokinezis-gátlási módszer esetében az alkalmazott citotoxicitás mérése, például CBPI vagy RI meghatározásával; citokinezis-gátlási módszerek alkalmazása nélkül az RICC vagy az RPD meghatározása; egyéb megfigyelések, ha vannak, például a sejtek egybefüggősége, apoptózis, nekrózis, metafázis-számolás, kétmagvú sejtek előfordulási gyakorisága;

— a kicsapódás jelei és a meghatározás időpontja;

— a kezelési közeg pH-jára és ozmolalitására vonatkozó adatok, amennyiben meghatározásra kerültek,

— az egymagvú, kétmagvú és többmagvú sejtek megoszlása, amennyiben citokinezis-gátlási módszer használatos;

— a mikronukleuszokkal rendelkező sejtek száma minden kezelt és kontrolltenyészetre megadva, valamint adott esetben annak meghatározása, hogy kétmagvú vagy egymagvú sejtben találhatók-e;

— amennyiben lehetséges, a koncentráció-válasz összefüggés;

— a párhuzamos negatív (oldószeres) és pozitív kontrollokra vonatkozó adatok (koncentrációk és oldószerek);

— történeti negatív (oldószeres) és pozitív kontrollokra vonatkozó adatok, a tartományok, az átlagok, a szórás, valamint az eloszlás esetében a 95 %-os ellenőrzési határértékek megadásával, továbbá az adatok száma;

— statisztikai elemzés; p-értékek, ha meghatározásra kerültek.

Az eredmények tárgyalása.

Következtetések.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 1-4.

(3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 3-15.

(4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios,* Vol. 43/172-173, pp. 233-246.

(5) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 167-172.

(6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols,* Vol. 2/5, pp. 1084-1104.

(7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research,* Vol. 161/2, pp. 193-198.

(8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 13/1, pp. 34-43.

▼M7

(9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research,* Vol. 234/5, pp. 9-20.

(10) Miller, B.M. *et al.* (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis,* Vol. 6/4, pp. 297-302.

(11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis,* Vol. 8/4, pp. 329-334.

(12) Migliore, L. *et al.* (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research,* Vol. 319/3, pp. 205-213.

(13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by anti-kinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis,* Vol. 8/6, pp. 519-525.

(14) Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research,* Vol. 322/1, pp. 9-20.

(15) Marshall, R.R. *et al.* (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research,* Vol. 372/2, pp. 233-245.

(16) Zijno, P. *et al.* (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 372/2, 211-219.

(17) Kirsch-Volders *et al.* (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research,* Vol. 540/2, pp. 153-163.

(18) E melléklet B.10., Mutagenitás – kromoszóma-rendellenességek in vitro vizsgálata emlősökön című fejezete.

(19) Lorge, E. *et al.* (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 13-36.

(20) Clare, G. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 37-60.

(21) Aardema, M.J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 61-87.

(22) Wakata, A. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 88-124.

(23) Oliver, J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 125-152.

(24) Albertini, S. *et al.* (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 187-208.

(25) Miller, B. *et al.* (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 45-59.

▼**M7**

(26) Miller, B. *et al.* (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research,* Vol. 410, pp. 81-116.

(27) Kalweit, S. *et al.* (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research,* Vol. 439/2, pp. 183-190.

(28) Kersten, B. *et al.* (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research,* Vol. 445/1, pp. 55-71.

(29) von der Hude, W. *et al.* (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Res*earch, Vol. 468/2, pp. 137-163.

(30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 517/1-2, pp. 123-134.

(31) Matsushima, T. *et al.* (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis,* Vol. 14/6, pp. 569-580.

(32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 1-152.

(33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro*micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Res*earch, Vol. 702/2, pp. 139-147.

(34) Hashimoto K. *et al.* (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and 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, Elérhető a következő címen: 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. Elérhető a következő címen: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(39) Corvi, R. *et al.* (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis,* Vol 23/4, pp. 271-283.

(40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research.*

▼**M7**

(41) Scott, D. *et al.* (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research,* Vol. 257/2, pp. 147-205.

(42) Morita, T. *et al.* (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research,* Vol. 268/2, pp. 297-305.

(43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.

(44) Long, L.H. *et al.* (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research,* Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

(45) Nesslany, F. *et al.* (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, pp. 439-452.

(46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 147/1-2, pp. 29-36.

(47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research,* Vol. 392, pp. 11-18.

(48) Payne, C.M. *et al.* (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825-840.

(49) Bazin, E. *et al.* (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, pp. 251-259.

(50) Le Hegarat, L. *et al.* (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555-560.

(51) Josse, R. *et al.* (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 295-304.

(52) Ehrlich, V. *et al.* (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis,* Vol. 17/3, pp. 257-260.

(53) Knasmüller, S. *et al.* (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology,* Vol. 198/1-3, pp. 315-328.

(54) Gibson, D.P. *et al.* (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 61-70.

(55) Bonassi, S. *et al.* (2001). HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. **37/1**, pp. 31-45.

(56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research,* Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

(57) Ong, T.-m. *et al.* (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, pp. 55-65.

▼**M7**

(58) Elliott, B.M. *et al.* (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis,* Vol. 7, pp. 175-177.

(59) Matsushima, T. *et al.* (1976). „A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F.J. *et al.* (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28, pp. 51-59.

(61) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Elérhető a következő címen: 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. Kérésre beszerezhető.

▼**M7**

(74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, pp. 32-56.

(75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

(76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(77) Sobol, Z. *et al.* (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research, Vol.*746/1, pp. 29-34.

(78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research,* Vol. 120/4, pp. 241-247.

(79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research,* Vol. 120/4, pp. 269-275.

(80) Bryce, S.M. *et al.* (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, pp. 280–286.

(81) Nicolette, J. *et al.* (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 355–362.

(82) Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33-40.

(83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris.

(84) Fenech, M. *et al.* (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 534/1-2, pp. 65-75.

(85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193-8.

(86) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology,* Vol. 85/8, pp. 873-99.

(87) Hayashi, M. *et al.* (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, pp. 87-90.

(88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). „*In vitro* micronucleus test', in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463-467.

(90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.

(91) Galloway, S.M. *et al.* (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

▼**M7**

(92) Richardson, C. *et al.* (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼M7

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Aneugén: olyan vegyi anyag vagy folyamat, amely a mitózissal vagy meiózissal történő sejtosztódási ciklus elemeivel kölcsönhatásba lépve a sejtek vagy organizmusok aneuploidiáját eredményezi.

Aneuploidia: a normális diploid (vagy haploid) kromoszómaszámtól egyetlen kromoszómával vagy egynél több, szám feletti kromoszómával, de nem teljes kromoszómakészlettel (kromoszómakészletekkel) (poliploidia) való bármely eltérés.

Apoptózis: programozott sejthalál olyan lépések során keresztül, amelyek a sejt membránhoz kötött részecskékre történő szétesését eredményezik; a részecskék ezután fagocitózissal vagy sejtfelszínről történő leválással kerülnek eltávolításra.

Sejtproliferáció: a sejtek számának növekedése mitotikus sejtosztódással.

Centroméra: a kromoszóma azon DNS-régiója, ahol a két kromatida összeér, és amelyhez a két kinetokor oldalirányban kapcsolódik.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Koncentrációk: a vizsgálati vegyi anyagnak a tenyészközegen belüli végleges koncentrációira utalnak.

Klasztogén: bármely olyan vegyi anyag vagy hatás, amely sejtek vagy eukarióta szervezetek populációjában szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket okoz.

Citokinezis: a mitózist közvetlenül követő sejtosztódási folyamat, amelynek eredményeként két utódsejt képződik egy-egy sejtmaggal.

Citokinezis-gátlási proliferációs index (CBPI): a kezelt populációban tapasztalható másodszor osztódó sejtek aránya a nem kezelt kontrollhoz képest (a képletet lásd a 2. függelékben).

Citosztázis: a sejtszaporodás gátlása (a képletet lásd a 2. függelékben).

Citotoxicitás: az e vizsgálati módszerbe tartozó, citokalazin-B jelenlétében végzett vizsgálatok esetében a citotoxicitás a kezelt sejtek citokinezis-gátlási proliferációs indexének (CBPI) vagy replikációs indexének (RI) csökkenése a negatív kontrollhoz viszonyítva (lásd a 26. pontot és a 2. függeléket).

Az e vizsgálati módszerbe tartozó, citokalazin-B nélkül végzett vizsgálatok esetében a citotoxicitás a kezelt sejtek relatív populációduplázódásának (RPD) vagy a relatív sejtszám-növekedésnek (RICC) a csökkenése a negatív kontrollhoz viszonyítva (lásd a 27. pontot és a 2. függeléket):

Genotoxikus: olyan általános kifejezés, amely magában foglalja a DNS- vagy kromoszómakárosodás valamennyi típusát, köztük a töréseket, a delékiókat, az adduktok képződését, a nukleotidok módosulását és kapcsolódását, az átrendeződéseket, a génmutációkat, a kromoszóma-rendellenességeket és az aneuploidiát. A genotoxikus hatás nem minden típusa eredményez mutációkat vagy stabil kromoszómakárosodást.

Interfázisban lévő sejtek: azok a sejtek, amelyek nincsenek a mitózis fázisában.

Kinetokor: protein tartalmú struktúra, amely a kromoszóma centroméra részén épül fel, és amelyhez a sejtosztódás során orsórostok kötődnek, lehetővé téve a leánykromoszómáknak az utódsejtek pólusai felé irányuló szabályos mozgását.

▼M7

Mikronukleusz: a sejtek fő magjától elkülönült kis járulékos mag, amelyet a mitózis (meiózis) telofázisa során hoznak létre visszamaradó kromoszómatöredékek vagy teljes kromoszómák.

Mitózis: a sejtmag osztódása, amely általában profázisra, prometafázisra, metafázisra, anafázisra és telofázisra osztható fel.

Mitotikus index: a metafázisban lévő sejtek és a sejtpopuláció összes sejtjének aránya; e populáció sejtproliferációja mértékének jelzése.

Mutagén: örökletes elváltozást idéz elő a génekben lévő DNS-bázispár szekvenciában/szekvenciákban vagy a kromoszómák szerkezetében (kromoszóma-rendellenességek).

Nondiszjunkció: a kromatidpárok nem válnak szét, és különülnek el a kifejlődő utódsejtekbe, rendellenes kromoszómaszámmal rendelkező utódsejteket eredményezve.

p53 státusz: A p53 fehérje vesz részt a sejtciklus-szabályozásban, az apoptózisban és a DNS-reparációban. Azok a sejtek, amelyeknél hiányzik funkcionális p53 fehérje, nem képesek apoptózis útján vagy a DNS-károsodásra reagáló p53 funkciókkal összefüggő egyéb mechanizmusok útján (például DNS-reparáció kiváltásával) leállítani a sejtciklust vagy eltávolítani a károsodott sejteket, elméletileg hajlamosabbnak kell lenniük génmutációkra vagy kromoszóma-rendellenességekre.

Poliploidia: ellentétben a csak egyetlen kromoszómát vagy bizonyos kromoszómákat érintő számszerű rendellenességekkel (aneuploidia), teljes kromoszómakészlet(ek) sejtekben és organizmusokban jelentkező számszerű rendellenessége.

Proliferációs index (PI): a citotoxicitás mérésére használható módszer olyan esetekben, amikor nem alkalmaznak citoB-t (a képletet lásd a 2. függelékben).

A sejtszám relatív növekedése (RICC): a citotoxicitás mérésére használható módszer olyan esetekben, amikor nem alkalmaznak citoB-t (a képletet lásd a 2. függelékben).

Relatív populációduplázódás (RPD): a citotoxicitás mérésére használható módszer olyan esetekben, amikor nem alkalmaznak citoB-t (a képletet lásd a 2. függelékben).

Replikációs index (RI): a kezelt tenyészetben tapasztalható sejtosztódási ciklusok aránya a nem kezelt kontrollhoz képest, az expozíciós időszakban és a visszanyerés időszakában (a képletet lásd a 2. függelékben).

S9 májfrakció: 9 000 g centrifugálás utáni májhomogenátum felülúszója, azaz a nyers májextraktum.

S9 keverék: az S9 májfrakció és a metabolikus enzimaktivitáshoz szükséges kofaktorok keveréke.

Oldószeres kontroll: a csak a vizsgálati vegyi anyag feloldására használatos oldószert befogadó kontrolltenyészetek meghatározására szolgáló általános kifejezés.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Nem kezelt kontroll: nem kezelt (azaz sem a vizsgálati vegyi anyaggal, sem oldószerrel nem kezelt), de a vizsgálati vegyi anyagot befogadó tenyészetekkel párhuzamosan, azonos módon feldolgozott tenyészetek.

▼M7

2. függelék

A CITOTOXICITÁS ÉRTÉKELÉSÉRE SZOLGÁLÓ KÉPLETEK

CitoB alkalmazása esetén a citotoxicitás értékelését a **citokinezis-gátlási proliferációs index (CBPI)** vagy a **replikációs index (RI)** alapján kell végezni (17) (69). A CBPI a sejtenkénti sejtmagok átlagos számát mutatja meg, így alkalmazható a sejtproliferáció kiszámítására. Az RI a citoB-expozíció időszaka alatt megmutatja a kezelt tenyészeteken belüli sejtenkénti sejtciklusok relatív számát a kontrolltenyészetekhez viszonyítva, így alkalmazható a %-os citosztázis kiszámítására.

$$\%\text{-os citosztázis} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

valamint:

T = a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt tenyészet

C = kontrolltenyészet

ahol:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{egymagvú sejtek száma}) + (2 \times \text{kétmagvú sejtek száma}) + (3 \times \text{többmagvú sejtek száma}))}{(\text{sejtek száma összesen})}$$

Tehát az 1-es CBPI (az összes sejt egymagvú) 100 %-os citosztázisnak felel meg.

Citosztázis = 100 – RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{kétmagvú sejtek száma}) + (2 \times \text{többmagvú sejtek száma}))/(\text{sejtek összes száma})_T}{((\text{kétmagvú sejtek száma}) + (2 \times \text{többmagvú sejtek száma}))/(\text{sejtek összes száma})_C} \times 100$$

T = kezelt tenyészetek

C = kontrolltenyészetek

Tehát az 53 %-os RI azt jelenti, hogy a kontrolltenyészetben kétmagvú és többmagvú sejtekké osztódott sejtek számához képest a kezelt tenyészetben ennek csak 53 %-a osztódott, vagyis a citosztázis 47 %-os.

Amennyiben citoB-t nem alkalmaznak, a citotoxicitás értékelésére a **sejtszám relatív növekedése (RICC)** vagy a **relatív populációduplázódás (RPD)** ajánlott (69), mivel mindkét módszer figyelembe veszi az osztódott sejtpopuláció arányát.

$$\textbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{a sejtszám növekedése a kezelt tenyészetekben(végsö–kiindulási)})}{(\text{a sejtszám növekedése a kontrolltenyészetekben(végsö–kiindulási)})} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{a populáció duplázódásának száma a kezelt tenyészetekben})}{(\text{a populáció duplázódásának száma a kontrolltenyészetekben})} \times 100$$

ahol:

Populációduplázódás = [log (kezelés utáni sejtszám ÷ kiindulási sejtszám)] ÷ log 2

Tehát az 53 %-os RICC vagy RPD 47 %-os citotoxicitást/citosztázist jelez.

▼M7

Proliferációs index (PI) alkalmazásával a citotoxicitás az 1 sejtből (cl1), 2 sejtből (cl2), 3-4 sejtből (cl4) és 5–8 sejtből (cl8) álló telepek megszámlálásával határozható meg.

$$\mathrm{PI} = \frac{((1 \times \mathrm{cl1}) + (2 \times \mathrm{cl2}) + (3 \times \mathrm{cl4}) + (4 \times \mathrm{cl8}))}{(\mathrm{cl1} + \mathrm{cl2} + \mathrm{cl4} + \mathrm{cl8})}$$

A PI a citotoxicitás értékes és megbízható paramétereként használatos a citoB nélkül *in vitro* tenyésztett sejtvonalak esetében is (35) (36) (37) (38), és hasznos további paraméternek tekinthető.

A kezelés előtti sejtszámnak minden esetben meg kell egyeznie a kezelt tenyészetek és a negatív kontrolltenyészetek esetében.

Míg az RCC (azaz a kezelt tenyészeteken belüli sejtszám és a kontrolltenyészeteken belüli sejtszám hányadosa) a múltban citotoxicitási paraméterként volt használatos, a továbbiakban már nem javasolt, mivel alulbecsülheti a citotoxicitást.

Automatizált értékelési rendszerek, például áramlási citometria, lézerszkenneléses citometria vagy képelemzés alkalmazása esetén a képletben a sejtszám helyettesíthető a sejtmagok számával.

A negatív kontrolltenyészetekben a populációduplázódásnak vagy a replikációs indexnek összeegyeztethetőnek kell lennie azzal a követelménnyel, hogy a sejtekből a kezelés után kb. 1,5–2,0 normál sejtciklusidőnek megfelelő időpontban kell mintát venni.

▼M3

B.50. BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: LOKÁLIS NYIROKCSOMÓ-VIZSGÁLATI MÓDSZER (LLNA): DA

BEVEZETÉS

1. Az OECD vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozó iránymutatásait és az uniós vizsgálati módszereket időnként felülvizsgálják a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és állatjóléti megfontolások fényében. A bőrszenzitizáció egereknél történő meghatározására szolgáló első vizsgálati módszer (B.42.), a lokális nyirokcsomó-vizsgálat (LLNA; az OECD 429. vizsgálati iránymutatása) átdolgozásra került (1). Az LLNA hitelesítésének részleteit és az ezzel kapcsolatos munka áttekintését publikálták (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Az LLNA során a limfociták proliferációjának mérése radioizotópos timidin vagy jód alkalmazásával történik, ezért amennyiben a radioaktív anyagok beszerzése, használata vagy ártalmatlanítása problémát jelent, a vizsgálat csak korlátozottan alkalmazható. Az LLNA: DA (a Daicel Chemical Industries, Ltd. fejlesztése) az LLNA nem radioaktív változata, amely az adenozin-trifoszfát (ATP) tartalom mennyiségi meghatározását bioluminescencia útján végzi, amely alkalmazható a limfocitaproliferáció indikátoraként. Az LLNA: DA vizsgálati módszert egy szakértőkből álló nemzetközi értékelő testület hitelesítette, vizsgálta felül és ajánlotta olyan módszerként, amely a bőrszenzitizációt okozó, illetve nem okozó vegyi anyagok meghatározására bizonyos megkötésekkel hasznosnak tekinthető (10) (11) (12) (13). A vizsgálati módszer célja a vegyi anyagok (anyagok és keverékek) bőrszenzibilizáló hatásának állatoknál történő felmérése. E melléklet B.6. fejezete és az OECD 406. vizsgálati iránymutatása tengerimalac-vizsgálatokat alkalmaz, nevezetesen a tengerimalac-maximizációs módszert és Bühler-vizsgálatot (14). Az LLNA (e melléklet B.42. fejezete; az OECD 429. vizsgálati iránymutatása) és a két nem radioaktív módosított eljárás, az LLNA: DA (e melléklet B.50. fejezete; az OECD 442. A. vizsgálati iránymutatása) és az LLNA: BrdU-ELISA (e melléklet B.51. fejezete; az OECD 442. B. vizsgálati iránymutatása) egyaránt előnyösebb a B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában (14) szereplő tengerimalac-vizsgálatnál abból a szempontból, hogy kevesebb állat használatát igényli és kíméletesebb.

2. Az LLNA-hoz hasonlóan az LLNA: DA is a bőrszenzibilizáció indukciós fázisát vizsgálja, és a dózis-válasz értékelésére alkalmas mennyiségi adatokat szolgáltat. Emellett azáltal, hogy a bőrszenzibilizáló anyagokat a DNS radioaktív jelölése nélkül lehet kimutatni, a munka során kiküszöbölhető a radioaktivitásnak való kitettség, valamint a hulladék ártalmatlanításának problémája. Ez viszont az egerek nagyobb arányú használatát jelentheti a bőrszenzibilizáló anyagok kimutatására, ami a bőrszenzibilizáló képesség vizsgálata során tovább csökkenthetné a tengerimalacok használatát (pl. B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (14).

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

3. Az alkalmazott fogalmak meghatározása az 1. függelékben található.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

4. Az LLNA: DA egy módosított LLNA módszer, amely bizonyos korlátozások mellett a potenciális bőrszenzibilizáló vegyi anyagok azonosítására szolgál. Ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy az LLNA vagy a tengerimalac-vizsgálat (lásd B.6. fejezet, az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (14) helyett minden esetben az LLNA: DA-t kell alkalmazni, inkább azt, hogy ez a vizsgálati módszer ugyanolyan hasznos, és olyan alternatív módszerként alkalmazható, amely esetében a pozitív és negatív eredmények általában már nem igényelnek további megerősítést (10) (11). A vizsgálat elvégzése előtt a vizsgáló laboratóriumnak a vizsgált anyagról rendelkezésre

▼M3

álló összes adatot figyelembe kell vennie. Ezen információk közé tartozik a vizsgált anyag azonosítása, kémiai szerkezete, fizikai-kémiai tulajdonságai, valamint a vizsgált anyaggal korábban végzett *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei és a szerkezetileg rokon vegyi anyagok toxikológiai adatai is. Mindezen információk figyelembevételével dönthető el, hogy az LLNA: DA módszer alkalmazható-e a vizsgált anyag esetében (tekintve, hogy bizonyos vegyianyag-típusoknál inkompatibilitás áll fenn [lásd az 5. bekezdést]), és milyen dózist célszerű választani a vizsgálatokhoz.

5. Az LLNA: DA *in vivo* módszer, következésképpen nem küszöbölhető ki vele az állatok felhasználása az allergiás kontakt szenzibilizáló hatás vizsgálata során. Ugyanakkor a tengerimalac-vizsgálatokhoz képest (B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) lehetővé teszi az állatok ilyen célú felhasználásának csökkentését (14). Továbbá az állatok kontakt szenzibilizációs vizsgálatok során történő felhasználásának módját tekintve az LLNA: DA jelentősen kíméletesebb (kevesebb fájdalmat és szenvedést okoz), mivel a B.6. fejezet és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásával ellentétben az LLNA: DA esetében nincs szükség indukált bőr-hiperszenzitivitási reakciók előidézésére. A B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában foglalt módszerrel (14) szembeni előnyei ellenére az LLNA: DA módszernek vannak bizonyos korlátai, amelyek szükségessé tehetik a B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában foglaltak alkalmazását (pl. bizonyos fémek vizsgálata, álpozitív eredmények bizonyos bőrirritáló anyagokkal [például bizonyos felületaktív anyagokkal] (6) [1, illetve e melléklet B.42. fejezete], vagy a vizsgált anyag oldhatósága). Továbbá az olyan funkcionális csoportokat tartalmazó anyagcsoportok, illetve anyagok, amelyek potenciális zavaró tényezőként szerepelnek (16) szükségessé tehetik a tengerimalac-vizsgálatok (vagyis a B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása (14)) használatát. Az LLNA esetében megállapított korlátozásokat (1, illetve e melléklet B.42. fejezete) az LLNA: DA módszerre is ajánlott alkalmazni (10). Ezenkívül az LLNA: DA módszer nem feltétlenül alkalmas olyan anyagok vizsgálatára, amelyek befolyásolják az ATP szintjét (például ATP-gátlóként ható anyagok) vagy az intracelluláris ATP pontos mérését (például az ATP-t bontó enzimek jelenléte vagy extracelluláris ATP jelenléte a nyirokcsomóban). E meghatározott hiányosságokon kívül, az LLNA: DA bármilyen anyag vizsgálatára megfelelő, kivéve, ha ezek az anyagok olyan tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek befolyásolják az LLNA: DA pontosságát. Emellett abban az esetben, ha a stimulációs indexre (SI) kapott érték 1,8 és 2,5 közé esik figyelembe kell venni a határértéken lévő pozitív eredmények lehetőségét is (lásd a 31–32. bekezdést). Ez egy legalább 1,8 értékű stimulációs indexszel rendelkező, 44 anyagot magában foglaló hitelesítési adatbázison alapul (lásd a 6. bekezdést), amely esetében az LLNA: DA módszer helyesen azonosította mind a 32, az LLNA módszer szerint szenzibilizáló anyagot, de hibásan azonosított három anyagot az LLNA módszerrel nem szenzibilizálóként meghatározott, 1,8 és 2,5 közötti SI-értékkel (vagyis határértéken lévő pozitív) rendelkező 12 anyagok közül (10). Mivel azonban az SI-értékek beállításához és a vizsgálat prediktív jellemzőinek kiszámításához ugyanazt az adatállományt alkalmazták, a megadott eredmények túlbecsülhetik a valós prediktív jellemzőket.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

6. Az LLNA: DA módszer hátterében az az alapelv áll, hogy a szenzibilizáló anyagok elsődleges limfocitaproliferációt indukálnak a vizsgált anyag alkalmazási területének nyirokelvezetéséről gondoskodó nyirokcsomókban. Ez a proliferáció arányos az alkalmazott allergén dózisával és erősségével, valamint egyszerű módszert biztosít a szenzibilizáció kvantitatív méréséhez. A proliferációt úgy mérik, hogy a vizsgálati csoportokban mért átlagos proliferációt összehasonlítják a vivőanyaggal kezelt csoportban mért proliferációval. Meghatározzák az egyes kezelt csoportokban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportokban mért átlagos proliferáció arányát, amelyet stimulációs

▼M3

indexnek (SI) neveznek, és amelynek legalább ≥ 1,8-nek kell lennie ahhoz, hogy indokolt legyen a vizsgált anyag potenciális bőrszenzibilizáló anyagként történő további vizsgálata. Az itt leírt eljárások az ATP tartalom biolumineszcenciával történő mérésén alapulnak (az ATP-ről ismert, hogy korrelál az élő sejtek számával) (17), amely az elvezető aurikuláris nyirokcsomókban lévő proliferáló sejtek számának növekedését jelzi (18) (19). A biolumineszcens módszer során alkalmazott luciferáz enzim ATP-ből és luciferinből fény képződését katalizálja a következő reakció lezajlásával:

$$ATP + luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxiluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + fény$$

A kibocsátott fény intenzitása lineáris összefüggést mutat az ATP koncentrációjával, és luminométerrel mérhető. A luciferin-luciferáz vizsgálat széles körében alkalmazott, érzékeny módszer az ATP mennyiségi meghatározására (20).

A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

7. Ehhez a vizsgálathoz az egér a választandó faj. A LLNA: DA módszerhez a hitelesítési vizsgálatokat kizárólag a CBA/J törzzsel végezték, amely ezért preferált törzsnek tekintendő (12) (13). Fiatal felnőtt nullipara és nem vemhes nőstény egereket kell használni. A vizsgálat elején az állatok korának 8-12 hétnek kell lennie, az állatok testtömege között az eltérésnek minimálisnak kell lennie, és a testtömeg nem haladhatja meg az átlagos testtömeg 20 %-át. Ha elegendő adat áll rendelkezésre arra nézve, hogy az LLNA: DA módszerrel kapott válaszreakcióban nincsenek jelentős törzs- és/vagy ivarspecifikus különbségek, akkor más törzsek, illetve hím állatok is alkalmazhatók.

Az állatok tartásának és etetésének körülményei

8. Az egereket csoportosan kell tartani (21), kivéve, ha az egyedenkénti tartásra megfelelő tudományos indok merül fel. A kísérleti állatok tartásául szolgáló helyiség hőmérsékletének 22 °C ± 3 °C-nak kell lennie. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem haladhatja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos, 12 órás sötét periódusok váltakozásával. Az etetéshez a szokásos laboratóriumi takarmány alkalmazható korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

Az állatok előkészítése

9. Az állatokat véletlenszerűen választják ki, majd egyedi azonosítóval látják el (viszont az állat fülén semmiféle azonosító nem alkalmazható), és a kezelés megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben tartják őket, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez. A kezelés megkezdése előtt minden állatot megvizsgálnak, hogy meggyőződjenek arról, nincs rajtuk látható bőrsérülés.

A dózisok előkészítése

10. A szilárd halmazállapotú vegyi anyagokat az egér fülén történő alkalmazás előtt oldószerben/vivőanyagban kell feloldani vagy szuszpendálni, és szükség esetén hígítani kell. A folyadék halmazállapotú vegyi anyagokat hígítatlanul vagy az adagolás előtt hígított formában lehet alkalmazni. A nem oldható vegyi anyagokat, például az orvosi eszközökben általánosan előforduló anyagokat megfelelő oldószerben történő agresszív extrakciónak kell kitenni, hogy a vizsgálat során az egér fülén való alkalmazás előtt az összes kivonható összetevőt feltárjuk. A vizsgált anyagokat naponta kell elkészíteni, kivéve, ha stabilitási adatok igazolják, hogy a tárolás elfogadható.

▼M3

A megbízhatóság ellenőrzése

11. A vizsgálat megfelelő teljesítményének megfelelő és reprodukálható szenzitivitással adott válaszreakciókkal történő igazolására pozitív kontrollanyagokat (PK) alkalmaznak olyan szenzibilizáló tesztanyagként, amelynél a válaszreakció mértéke pontosan meghatározott. Pozitív kontroll párhuzamos vizsgálata ajánlott, mert ez igazolja, hogy a laboratórium megfelelő szakértelemmel végzi az egyes vizsgálatokat, és lehetővé teszi a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság és összehasonlíthatóság értékelését. Néhány szabályozó hatóság szintén előírja a pozitív kontroll minden vizsgálat során történő alkalmazását, ezért az LLNA: DA módszer elvégzése előtt ajánlott egyeztetni az illetékes hatóságokkal. Ennek megfelelően javasolt a pozitív kontroll rutinszerű párhuzamos vizsgálata, hogy elkerülhetőek legyenek az olyan további állatkísérletek, amelyeket a pozitív kontrollt csak időszakosan alkalmazó laboratórium az előírásoknak való megfelelés érdekében végezne (lásd a 12. bekezdést). A pozitív kontrollnak az LLNA: DA módszerrel olyan expozíciós szint mellett kell pozitív válaszreakciót adnia, amely a negatív kontrollcsoporthoz (NK) képest várhatóan legalább 1,8-del növeli a stimulációs indexet (SI). A pozitív kontroll dózisát úgy kell megválasztani, hogy ne okozzon túlzott bőrirritációt vagy szisztémás toxicitást, és az indukció reprodukálható, de ne túl nagymértékű legyen (például SI > 10 már túlzottnak tekinthető). Az előnyben részesítendő pozitív kontrollanyagok a 25 %-os hexil-cinnemaldehid (Chemical Abstracts Service [CAS] szám: 101-86-0) és a 25 %-os eugenol (CAS-szám: 97-53-0) aceton:olívaolaj (4:1, v/v) arányú keverékében. Adódhatnak olyan körülmények, amelyek fennállásakor, megfelelő indoklás esetén a fenti kritériumoknak megfelelő más pozitív kontrollanyagok is alkalmazhatók.

12. Bár ajánlott a pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata, lehetnek azonban olyan helyzetek, amikor a pozitív kontroll időszakos (például legalább 6 havonta végzett) vizsgálata elfogadható lehet az LLNA: DA vizsgálatot rendszeresen (vagyis legalább havonta egyszeri gyakorisággal) végző laboratóriumok esetében, amelyek rendelkeznek pozitív kontrollok igazolt, historikus adatbázisával, és ezzel bizonyítható, hogy a laboratórium a pozitív kontrollokkal képes reprodukálható és pontos eredményeket előállítani. Az LLNA: DA módszerben való jártasság alátámasztható a pozitív kontrollal megfelelő időszakon belül (kevesebb mint egy éve) végzett legalább 10 független vizsgálat során kapott következetesen pozitív eredményekkel.

13. Pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata minden alkalommal szükséges, valahányszor az LLNA: DA vizsgálati módszerében változtatást hajtanak végre (például a képzett személyzet, a vizsgálati eljárás során használt anyagok és/vagy reagensek, a vizsgálati eszközök, a kísérleti állatok beszerzési forrásának megváltoztatása), és ezeket a változásokat dokumentálni kell a laboratóriumi jelentésekben. Figyelembe kell venni, hogy ezek a változtatások mennyiben befolyásolják a korábban létrehozott historikus adatbázis megfelelőségét, és el kell dönteni, hogy szükséges-e új historikus adatbázis felállítása a pozitív kontroll eredményei következetességének dokumentálása érdekében.

14. A vizsgálatot végző személyeknek tisztában kell lenniük azzal, hogy amennyiben a párhuzamos vizsgálat helyett a pozitív kontrollok időszakos vizsgálata mellett döntenek, ez hatással lehet a pozitív kontrollok időszakos vizsgálatai közötti időszakokban, párhuzamos pozitív kontroll vizsgálata nélkül előállított negatív vizsgálati eredmények megfelelőségére és elfogadhatóságára. Ha például a pozitív kontrollal végzett időszakos vizsgálat álnegatív eredményt adott, akkor megkérdőjelezhetők azok a negatív eredmények, amelyek az utolsó elfogadható eredményű és az elfogadhatatlan eredményű időszakos pozitív kontroll vizsgálat között eltelt időszakban keletkeztek. Az ilyen következmények jelentőségét körültekintően mérlegelni kell annak eldöntésekor, hogy pozitív kontrollokat párhuzamosan vagy csak időszakosan vizsgáljanak-e. Szintén megfontolandó a kevesebb állat használata a párhuzamos pozitív kontrollcsoportban, amennyiben ez tudományosan indokolt, és a laboratóriumra specifikus historikus adatok alapján a laboratórium igazolja, hogy megfelelő a kevesebb egér használata (22).

▼M3

15. Bár a pozitív kontrollt olyan vivőanyagban kell vizsgálni, amelyről ismert, hogy következetes válaszreakciót vált ki (például aceton:olívaolaj; 4:1, v/v arányú keveréke), lehetnek olyan szabályozási helyzetek, amikor nem szokványos vivőanyagokban (klinikailag/kémiailag releváns készítmény) történő vizsgálat elvégzésére is szükség van (23). Amennyiben a párhuzamos pozitív kontrollt a vizsgált anyagétól eltérő vivőanyagban vizsgálják, akkor a párhuzamos pozitív kontrollal együtt egy külön vivőanyagos kontrollt is vizsgálni kell.

16. Azokban az estekben, amikor egy bizonyos vegyi csoportba tartozó anyagokat vagy a válaszreakciók tartományát értékelik, szintén hasznos lehet a referenciaanyagok alkalmazása annak igazolására, hogy a vizsgálati módszer megfelelően működik az ilyen típusú anyagok bőrszenzibilizáló hatásának kimutatására. A megfelelő referenciaanyagoknak a következő tulajdonságokkal kell rendelkezniük:

— szerkezeti és funkcionális hasonlóság a vizsgált anyag csoportjával,

— ismert fizikai/kémiai tulajdonságok,

— az LLNA: DA módszerrel kapott alátámasztó adatok,

— egyéb állatmodellekből és/vagy emberből származó alátámasztó adatok.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

Az állatok száma és a dózisszintek

17. Minden dóziscsoportban legalább négy állatot kell használni, és a vizsgált anyagból legalább három különböző koncentrációt, továbbá párhuzamos negatív kontrollcsoportot, amelyet csak a vizsgált anyaghoz használt vivőanyaggal kezelnek, valamint egy pozitív kontroll csoportot kell alkalmazni (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11–15. bekezdésben foglaltakat). Megfontolandó a pozitív kontroll többféle dózisának vizsgálata, különösen, ha a pozitív kontroll vizsgálatát időszakosan végzik. A kontrollcsoportban lévő állatokkal ugyanúgy kell bánni és dolgozni, mint a kezelt csoportokban lévőkkel, azzal a kivétellel, hogy az állatokat nem kezelik a vizsgált anyaggal.

18. A dózist és a vivőanyagot a (2) és (24) számú hivatkozásokban megadott ajánlások alapján kell kiválasztani. Az egymás utáni dózisok kiválasztása általában megfelelő koncentrációsorból, például 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % stb. történik. Az alkalmazott koncentrációsort megfelelő tudományos megfontolások alapján kell kiválasztani. A három egymás utáni koncentráció kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált anyagról esetlegesen rendelkezésre álló valamennyi toxikológiai információt (például akut toxicitás és bőrirritáció), valamint szerkezeti és fizikai-kémiai adatot, hogy a legmagasabb koncentrációval a lehető legnagyobb expozíciót idézzük elő, amely még nem okoz szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű lokális bőrirritációt (24) (25). Ilyen jellegű információk hiányában szükséges lehet a megelőző előszűrő vizsgálat (lásd 21–24. bekezdés).

19. A vivőanyagnak nem szabad megzavarnia vagy befolyásolnia a vizsgálat eredményét, és aszerint kell kiválasztani, hogy a vizsgált anyag oldhatósága a lehető legnagyobb koncentráció elérése érdekében maximális legyen, ugyanakkor a vizsgált anyag felvitelére alkalmas oldatot/szuszpenziót kapjunk. A javasolt vivőanyagok az aceton:olívaolaj (4:1 v/v) keveréke, N,N-dimetilformamid, metil-etil-keton, propilén-glikol és dimetil-szulfoxid (6), de megfelelő tudományos indoklás esetén más vivőanyagok is alkalmazhatók. Bizonyos esetekben további kontrollként szükséges lehet valamely klinikai szempontból releváns oldószer használata, vagy annak a kereskedelmi formulának az alkalmazása, amelyben a vizsgált anyagot forgalomba hozzák. Különösen vigyázni kell arra, hogy megfelelő szolubilizáló szerek (pl. 1 % Pluronic® L92) alkalmazásával a hidrofil anyagokat olyan vivőanyag-rendszerbe építsük be, amely benedvesíti a bőrt, de nem folyik le azonnal. A teljesen vizes alapú vivőanyagokat tehát kerülni kell.

▼M3

20. A nyirokcsomók egyedenként történő feldolgozása lehetővé teszi az egyedek közötti variabilitás, valamint a vizsgált anyaggal és a vivőanyaggal kezelt csoport eredményeinek statisztikai összehasonlítását (lásd a 33. bekezdést). Emellett csak akkor lehet értékelni, hogy lehetséges-e csökkenteni a pozitív kontrollcsoportban lévő egerek számát, ha az egyedi állatokra vonatkozóan gyűjtünk adatokat (22). Ezen túlmenően, egyes szabályozó hatóságok is megkövetelik az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtést. Az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtés rendszeresítése állatjóléti előnyökkel jár azáltal, hogy elkerülhető a vizsgálatok megismétlése abban az esetben, amikor a vizsgált anyagról eredetileg csak egyféleképpen gyűjtötték az adatokat (pl. összevont állatkísérletes adatok), míg a szabályozó hatóság később eltérő követelményeket állít fel (pl. egyedi állatokon alapuló adatok).

Előszűrő vizsgálat

21. A legmagasabb vizsgálandó dózis meghatározását lehetővé tevő információ hiányában (lásd a 18. bekezdést) az LLNA: DA módszerhez alkalmazandó megfelelő dózisszint megállapítása érdekében előszűrő vizsgálatot kell végezni. Az előszűrő vizsgálat célja, hogy támpontot adjon az LLNA: DA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózis kiválasztásához, amennyiben a szisztémás toxicitást (lásd a 24. bekezdést) és/vagy nagyfokú bőrirritációt (lásd a 23. bekezdést) okozó koncentrációra vonatkozó információk nem állnak rendelkezésre. Folyadékok esetében a legmagasabb vizsgált dózisnak 100 %-os koncentrációnak kell lennie, szilárd anyagok vagy szuszpenziók esetében pedig a lehetséges maximális koncentrációnak.

22. Az előszűrő vizsgálatot a fő LLNA: DA vizsgálathoz hasonló körülmények között kell végezni, eltekintve attól, hogy nem kell a nyirokcsomó proliferációt értékelni, valamint dóziscsoportonként kevesebb állat használható. Dóziscsoportonként egy vagy két állat javasolt. Az egereket a szisztémás toxicitás, illetve az alkalmazás helyén fellépő helyi irritáció jeleinek szempontjából naponta megfigyelik. A testtömeget a vizsgálat előtt és az állat exterminálása előtt is (8. nap) feljegyzik. A bőrpírt az egerek mindkét fülén vizsgálják és pontozzák az 1. táblázat (25) szerint. A fülvastagság értékeit egy vastagságmérővel (például digitális mikrométer, vagy Peacock Dial vastagságmérő) állapítják meg az 1. napon (az adagolás előtt), a 3. napon (hozzávetőleg 48 órával az első dózis után), valamint a 7. napon (az exterminálás előtt 24 órával) és a 8. napon. A 8. napon a fülvastagságot ezen kívül a fülből lyukasztással eltávolított szövet tömegének meghatározásával is meg lehet állapítani, amit az állat exterminálása után kell elvégezni. Nagyfokú helyi irritációnak minősül a legalább ≥ 3-as pontszámú bőrpír és/vagy legalább ≥ 25 %-os fülvastagság a vizsgálat bármely napján (26) (27). A fő LLNA: DA vizsgálathoz azt a dózist kell maximális dózisként választani, amely az előszűrés során alkalmazott koncentrációsorban (lásd a 18. bekezdést) a szisztémás toxicitást és/vagy nagyfokú helyi bőrirritációt okozó koncentrációnál eggyel alacsonyabb.

1. táblázat

Bőrpír (erythema) pontszámai

Megfigyelés	Pontszám
Nincs erythema	0
Nagyon enyhe erythema (alig észlelhető)	1
Jól körülírt erythema	2

▼M3

Megfigyelés	Pontszám
Közepes-súlyos erythema	3
Súlyos (céklavörös elszíneződés), pörkképződéig terjedő erythema, amely lehetetlenné teszi az erythema besorolását	4

23. A 25 %-os fülvastagság-növekedésen felül (26) (27), a bőrirritáló anyagok LLNA módszerrel végzett kimutatásához a kezelt állatok fülvastagságának kontrollcsoporthoz viszonyított statisztikailag szignifikáns növekedését is használják (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Noha 25 % alatti fülvastagság esetén előfordulhat statisztikailag szignifikáns növekedés, a nagyfokú irritációval azonban ezt különösen nem hozták összefüggésbe (30) (31) (32) (33) (34).

24. Az integrált értékelés részeként alkalmazva a következő klinikai tünetek jelezhetnek szisztémás toxicitást (35), és ezáltal kijelölhetik a fő LLNA: DA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózist: az idegrendszer működésében bekövetkező változások (például piloerekció, ataxia, tremorok és görcsrohamok); a viselkedésben bekövetkező változások (például agresszivitás, a tisztálkodási tevékenységekben bekövetkező változás, az aktivitási szint jelentős változása); a légzési mintázat változása (például a légvételek gyakoriságában és az intenzitásában bekövetkező változás, úgymint dyspnoe, zihálás és szörtyzörejek), valamint változások az táplálék- és vízfogyasztásban. Továbbá az értékelés során figyelembe kell venni a letargia és/vagy reakciókészség hiányának jeleit, valamint az enyhénél és pillanatnyinál fokozottabb fájdalom vagy szenvedés bármilyen klinikai tünetét, az > 5 %-nál nagyobb arányú testtömeg-csökkenést az 1. naptól a 8. napig tartó időszakban, valamint a mortalitást. Az elhullásközeli állapotban lévő vagy súlyos fájdalmak és szenvedés jeleit mutató állatokat humánus módon exterminálni kell (36).

A fő vizsgálat kísérleti ütemterve

25. A vizsgálat kísérleti ütemterve a következő:

— *1. nap:* Külön meg kell határozni, és fel kell jegyezni mindegyik állat testtömegét és az esetleges klinikai megfigyeléseket. Vigyük fel 1 % nátrium-lauril-szulfát (SLS) vizes oldatát mindkét fül dorzális oldalára egy SLS-oldatba mártott kefével, és négy-öt húzással be kell fedni a fülek teljes dorzális felszínét. Az SLS-tal végzett kezelés után egy órával vigyünk fel a vizsgált anyag megfelelő hígításából 25 µl-t, valamint a vivőanyagot önmagában, illetve pozitív kontrollt (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11–15. bekezdésekben foglaltakat) a fülek dorzális oldalára.

— *2., 3. és 7. nap:* Az 1. napnak megfelelően ismételjük meg az SLS 1 %-os vizes oldatával végzett előkezelést, valamint a vizsgált anyag felviteli eljárását.

— *4., 5. és 6. nap:* Nincs kezelés.

— *8. nap:* Fel kell jegyezni minden állat testtömegét és minden klinikai megfigyelést. Az állatokat az alkalmazás megkezdése után körülbelül 24–30 órával a 7. napon humánus módon exterminájuk. Mindegyik egér füléből vágjuk ki a kezelt terület nyirokelvezetéséről gondoskodó füli nyirokcsomókat, és tegyük be azokat állatonként külön-külön foszfáttal pufferelt sóoldatba (PBS). A nyirokcsomók azonosításának és preparálásának részletei és az ehhez kapcsolódó ábrák az (22) hivatkozásban találhatók. A helyi bőrreakció fő vizsgálatban történő további monitorozásához olyan további paramétereket lehet belevenni a vizsgálati protokollba, mint például a bőrpír pontozása vagy a fülvastagság mérése (akár vastagságmérővel, akár elölés utáni füldarabsúly-meghatározással).

▼M3

A sejtszuszpenziók elkészítése

26. Mindegyik egér esetében el kell készíteni a két oldalról kimetszett nyirokcsomó-sejtek (LNC) különálló sejtekből álló szuszpenzióját; ehhez a nyirokcsomót két üveg tárgylemez közé kell helyezni, és a nyirokcsomók összetöréséhez enyhe nyomást kell rá gyakorolni. Miután meggyőződtünk róla, hogy a szövet vékony rétegben szétterjedt, válasszuk szét a két tárgylemezt. Szuszpendáljuk a két tárgylemezen található szövetet PBS-ben; ehhez a tárgylemezeket Petri-csésze fölött ferdén tartva öblítsük le PBS-oldattal, eközben sejtkaparóval kaparjuk le a szövetet a tárgylemezről. A negatív kontrollként szolgáló állatok nyirokcsomói kisméretűek, ezért az SI-értékre gyakorolt mesterséges hatások elkerülése érdekében fontos az elővigyázatos kezelés. A két tárgylemez leöblítéséhez összesen 1 ml térfogatú PBS-oldatot kell használni. A Petri-csészében lévő LNC-szuszpenziót a sejtkaparóval enyhén homogenizálni kell. Ezután az LNC-szuszpenzióból mikropipettával 20 µl-nyi adagot fel kell szívni, ügyelve arra, hogy szemmel látható membránt ne szívjunk fel, majd el kell keverni 1,98 ml PBS-oldattal, hogy 2 ml-nyi mintát kapjunk. Ezután ugyanilyen eljárással újabb 2 ml-es mintát kell készíteni, hogy minden állat esetében két minta álljon rendelkezésre.

A sejtproliferáció meghatározása (a limfociták ATP-tartalmának mérése)

27. A nyirokcsomók ATP-tartalmában bekövetkezett növekedést a luciferin/luciferáz módszerrel ATP-mérési készlet segítségével határozzuk meg, amely a biolumineszcenciát relatív lumineszcencia egységekben (RLU) méri. A vizsgálat idejének az állat exterminálásától az ATP-tartalom méréséig mindegyik állat esetében azonosnak, körülbelül 30 percesnek kell lennie, ugyanis az ATP tartalom az állat exterminálása után idővel feltételezhetően fokozatosan csökken (12). Tehát az eljárások sorát az aurikuláris nyirokcsomók kimetszésétől az ATP méréséig, az előre meghatározott, mindegyik állat esetében azonos ütemterv szerint 20 percen belül el kell végezni. Az ATP-lumineszcenciát mindegyik 2 ml-es mintában mérni kell, hogy minden állat esetében összesen két ATP mérési eredmény álljon rendelkezésre. Ezután meghatározzuk az átlagos ATP-lumeneszcenciát, és a további számításokhoz ezt alkalmazzuk (lásd a 30. bekezdést).

MEGFIGYELÉSEK

Klinikai megfigyelések

28. Naponta legalább egyszer minden egérnél meg kell vizsgálni az alkalmazás helyén kialakuló lokális vagy szisztémás toxicitás esetleges tüneteit. Minden megfigyelést szisztematikusan fel kell jegyezni minden egyes egér esetében, egyedi adatsor felvételével. A monitoring tervnek tartalmaznia kell azon kritériumokat, amelyek alapján azonnal azonosíthatóak az eutanáziát igénylő, szisztémás toxicitást, kiterjedt helyi bőrirritációt vagy bőrkorróziót mutató egerek (36).

Testtömeg

29. Ahogyan az a 25. bekezdésben szerepel, az egyes állatok testtömegét a vizsgálat kezdetén, valamint a humánusan történő exterminálás tervezett időpontjában kell megmérni.

AZ EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

30. Az egyes kezelési csoportokra vonatkozó eredményeket átlagos stimulációs indexben (SI) fejezzük ki. Az SI kiszámítása úgy történik, hogy a vizsgált anyaggal kezelt egyes csoportokban és a pozitív kontrollcsoportban kapott állatonkénti átlagos RLU-értéket el kell osztani az oldószerrel/vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport átlagos állatonkénti RLU-értékével. A vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportok átlagos SI-értéke tehát 1.

▼M3

31. A válaszreakciót akkor lehet pozitívan értékelni, ha a stimulációs index ≥ 1,8 (10). Amikor azonban azt kell meghatározni, hogy egy határértéken lévő eredmény (vagyis amikor az SI-érték 1,8 és 2,5 között van) pozitívnak tekintendő-e, akkor a dózis-válasz összefüggés erőssége, a statisztikai szignifikancia és az oldószerrel/vivőanyaggal, valamint a pozitív kontrollal kapott válaszreakciók következetessége is felhasználható (2) (3) (37).

32. Az 1,8 és 2,5 közötti SI-vel járó, határértéken lévő pozitív válaszreakciók esetében a felhasználók dönthetnek úgy, hogy az eredmények pozitivitásának megerősítéséhez további információkat – például a dózis-válasz összefüggést, szisztémás toxicitás vagy nagyfokú irritáció jelét, illetve adott esetben a statisztikai szignifikanciát az SI értékekkel együtt – kívánnak figyelembe venni (10). Figyelembe kell venni a vizsgált anyag különféle tulajdonságait is, köztük azt, hogy mutat-e szerkezeti rokonságot ismert bőrszenzibilizáló anyagokkal, okoz-e nagyfokú bőrirritációt egereknél, illetve a megfigyelt dózis-válasz összefüggés jellegét. Ezek, illetve további megfontolások részletesebb tárgyalását lásd a (4) hivatkozásban.

33. Az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtés lehetővé teszi a dózis-válasz összefüggés adatokban tükröződő fennállásának és mértékének statisztikai elemzését. Bármely statisztikai elemzés tartalmazhatja a dózis-válasz összefüggés értékelését, valamint a vizsgálati csoportok megfelelően korrigált összehasonlításait (például a dóziscsoportok páronkénti összehasonlítása a párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollcsoportokkal). A statisztikai elemzésekben a dózis-válasz tendenciák értékelésénél szerepelhet például lineáris regresszió vagy William-féle próba, a páronkénti összehasonlításoknál pedig Dunnett-féle próba. A megfelelő statisztikai elemzési módszer kiválasztásakor a vizsgálónak figyelemmel kell lennie a lehetséges varianciaegyenlőtlenségekre és más kapcsolódó problémákra, amelyek miatt az adatok transzformációjára vagy nem paraméteres statisztikai elemzésre lehet szükség. A vizsgálónak minden esetben el kell végeznie az SI-k kiszámítását és statisztikai elemzéseket bizonyos adatpontokkal (az úgynevezett „kiugró adatokkal”) és azok nélkül.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

34. Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, feltüntetve az egyedi állatok RLU-értékeit, a csoport átlagos RLU/állat értékét, a hozzá tartozó hibamutatóval (például SD, SEM), valamint az egyes dóziscsoportokban kapott átlagos stimulációs indexeket (SI) összehasonlítva a párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollcsoport értékeivel.

Vizsgálati jelentés

35. A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyagok és kontrollanyagok:

— azonosító adatok (pl. adott esetben a CAS-szám és az EU-szám; eredet; tisztaság; ismert szennyezők; tételszám),

— fizikai megjelenés és fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. illékonyság, stabilitás, oldhatóság),

— elegy esetén annak összetétele és az egyes komponensek egymáshoz viszonyított aránya,

Oldószer/vivőanyag:

— azonosító adatok (adott esetben tisztaság; koncentráció; alkalmazott térfogat),

— a vivőanyag kiválasztásának indoklása,

▼M3

Kísérleti állatok:

— CBA egértörzs származása,

— az állatok mikrobiológiai státusa, amennyiben ismert,

— az állatok száma és életkora,

— az állatok származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.,

Vizsgálati körülmények:

— az ATP készlet származása, tételszáma, a gyártó minőségbiztosítási/minőség-ellenőrzési adatai,

— a vizsgált anyagból előállított készítménnyel és annak alkalmazásával kapcsolatos adatok,

— a dózisszintek megválasztásának indoklása (ezen belül adott esetben az előszűrési vizsgálatok eredményei),

— a vivőanyag és a vizsgált anyag alkalmazott koncentrációja, valamint a vizsgált anyagból alkalmazott teljes mennyiség,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány típusa/eredete, a víz eredete),

— a kezelés adatai és a mintavételek ütemezése,

— a toxicitás mérésére alkalmazott módszerek,

— a pozitív és negatív vizsgálati eredmény kimondásának kritériumai,

— a protokolltól való esetleges eltérések adatai, és annak kifejtése, hogy az eltérés hogyan érintheti vizsgálati tervet és az eredményeket,

A megbízhatóság ellenőrzése:

— a legutóbbi megbízhatósági ellenőrzés eredményeinek összefoglalása az alkalmazott anyag, koncentráció és vivőanyag adataival együtt,

— a vizsgálólaboratórium párhuzamosan és/vagy korábban vizsgált pozitív és párhuzamosan vizsgált negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollokra vonatkozó adatai,

— ha nem vizsgáltak párhuzamosan pozitív kontrollt, a laboratóriumban legutóbb végzett időszakos pozitív kontroll dátuma és laboratóriumi jelentése, valamint pozitív kontroll vizsgálatának korábbi adatait részletező jelentés, amely indokolja, hogy miért nem végzik a laboratóriumban pozitív kontroll párhuzamos vizsgálatát,

Eredmények:

— az egyes állatok testtömege a kezelés kezdetén és az exterminálás tervezett időpontjában, illetve az átlagos és vonatkozó hibamutatók (pl. SD, SEM) kezelési csoportonként,

— a toxicitási tünetek, ezen belül az alkalmazás helyén esetleg kialakuló bőrirritáció megjelenésének időpontja és időbeli alakulása minden egyes állatra vonatkozóan,

— az állat exterminálásának időpontja és az ATP mérésének időpontja az egyes állatok esetében,

— az állatonkénti RLU-értékek és dóziscsoportonkénti SI-értékek táblázata,

— átlagos és kapcsolódó hibamutatók (pl. SD, SEM) az állatonkénti RLU-értékek esetében, az egyes kezelés csoportokban, és a kiugró értékek elemzése az egyes kezelési csoportokban,

▼M3

— a kiszámított SI és a variabilitás megfelelő mutatója, amely az egyedek közti variabilitást a vizsgált anyaggal kezelt csoportban és a kontrollcsoportokban egyaránt figyelembe veszi,

— dózis-válasz összefüggés,

— adott esetben statisztikai elemzések,

Az eredmények tárgyalása:

— rövid kommentár az eredményekhez, a dózis-válasz elemzéshez és adott esetben a statisztikai elemzésekhez, és következtetés levonása arra vonatkozóan, hogy a vizsgált anyagot bőrszenzibilizáló hatásúnak kell-e tekinteni vagy sem.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.

(38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: A vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezés” megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (38).

Referenciaanyag: A vizsgált anyaggal való összehasonlítás céljából etalonként használt szenzibilizáló vagy nem szenzibilizáló anyag. A referenciaanyaggal szemben a következő elvárások fogalmazhatók meg: i. állandó és megbízható beszerzési forrásból vagy forrásokból kell származnia; ii. a vizsgált anyagok csoportjához hasonló szerkezettel és funkcionalitással kell rendelkeznie; iii. ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; iv. rendelkezésre kell állniuk az anyag ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és v. a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

Álnegatív eredmény: Valamely vizsgálati módszerrel tévesen negatívnak vagy inaktívnak minősített anyag, amely valójában pozitív vagy aktív.

Álpozitív: Valamely vizsgálattal tévesen pozitívnak vagy aktívnak minősített anyag, amely valójában negatív vagy inaktív.

Veszély: Káros egészségügyi vagy ökológiai hatások előidézésének lehetősége. A káros hatás csak akkor jelenik meg, ha kellő szintű az expozíció.

Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság: Annak mértéke, hogy a különböző minősített laboratóriumok azonos protokoll és azonos vizsgált anyagok alkalmazásával mennyire képesek minőségileg és mennyiségileg azonos eredményeket produkálni. A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság az előhitelesítési és hitelesítési folyamat során kerül meghatározásra, és annak mértékét jelzi, hogy az adott vizsgálat mennyire sikeresen vihető át laboratóriumok között; más néven laboratóriumok közötti megismételhetőség (38).

Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság: Annak meghatározása, hogy az ugyanazon laboratóriumban dolgozó képzett személyek meghatározott protokoll különböző időpontokban történő alkalmazásával mennyire sikeresen tudják reprodukálni az eredményeket. Más néven laboratóriumon belüli megismételhetőség (38).

Kiugró érték: A kiugró érték olyan megfigyelés, amely szembetűnően eltér az egy populációból vett véletlenszerű minta egyéb értékeitől.

Minőségbiztosítás: Irányítási folyamat, amelynek során a laboratóriumi vizsgálati szabványok és követelmények betartását, a jegyzőkönyvek vezetését, valamint az adattovábbítás pontosságát a vizsgálatot végző személyektől független személyek ellenőrzik.

Megbízhatóság: Azonos protokoll szerint végzett vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóságának mérésére szolgál. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (38).

Bőrszenzibilizáció: Immunológiai folyamat, amely akkor jelentkezik, ha egy érzékeny egyén lokálisan érintkezik valamely indukáló hatású allergén vegyi anyaggal, amely esetlegesen kontakt szenzibilizáció kialakulásához vezető immunválaszt vált ki a bőrben.

Stimulációs index (SI): Adott vizsgált anyag bőrszenzibilizációt okozó képességének meghatározására kiszámított érték, amely az anyaggal kezelt csoportban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportban tapasztalt proliferáció aránya.

Vizsgált anyag (más néven vizsgált vegyi anyag): Bármely anyag vagy keverék, amelyet ezzel a vizsgálati módszerrel vizsgálnak.

▼M3

B.51. **BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: LOKÁLIS NYIROKCSOMÓ-VIZSGÁLATI MÓDSZER (LLNA): BRDU-ELISA**

BEVEZETÉS

1. Az OECD vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozó iránymutatásait és az uniós vizsgálati módszereket időnként felülvizsgálják a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és állatjóléti megfontolások fényében. A bőrszenzibilizáció egereknél történő meghatározására szolgáló első vizsgálati módszer (B.42.), a lokális nyirokcsomó-vizsgálat (LLNA; az OECD 429. vizsgálati iránymutatása) átdolgozásra került (e melléklet 1. és B.42. fejezete). Az LLNA hitelesítésének részleteit és az ezzel kapcsolatos munka áttekintését publikálták (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Az LLNA során a limfociták proliferációjának mérése radioizotópos timidin vagy jód alkalmazásával történik, ezért amennyiben a radioaktív anyagok beszerzése, használata vagy ártalmatlanítása problémát jelent, a vizsgálat csak korlátozottan alkalmazható. Az LLNA: BrdU-ELISA (enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat) az LLNA vizsgálati módszer nem radioaktív változata, amely radioaktívan nem jelölt 5-bromo-2-dezoxiuridin (BrdU) (Chemical Abstracts Service [CAS] szám: 59-14-3) felhasználásával, ELISA alapú vizsgálati rendszerben méri a limfocitaproliferációt. Az LLNA: BrdU-ELISA-t vizsgálati módszert egy szakértőkből álló független nemzetközi értékelő testület hitelesítette, vizsgálta felül és ajánlotta olyan módszerként, amely a bőrszenzibilizációt okozó, illetve nem okozó vegyi anyagok meghatározására bizonyos megkötésekkel hasznosnak tekinthető (10) (11) (12). A vizsgálati módszer célja a vegyi anyagok (anyagok és keverékek) bőrszenzibilizáló hatásának állatoknál történő felmérése. E melléklet B.6. fejezete és az OECD 406. vizsgálati iránymutatása tengerimalac-vizsgálatokat alkalmaz, nevezetesen a tengerimalac-maximizációs módszert és Bühler-vizsgálatot (13). Az LLNA (e melléklet B.42. fejezete; az OECD 429. vizsgálati iránymutatása) és a két nem radioaktív módosított eljárás, az LLNA: BrdU-ELISA (e melléklet B.51. fejezete; az OECD 442. B. vizsgálati iránymutatása) és az LLNA: DA (e melléklet B.50. fejezete; az OECD 442. A. vizsgálati iránymutatása) egyaránt előnyösebb a B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában (13) szereplő tengerimalac-vizsgálatnál abból a szempontból, hogy kevesebb állat használatát igényli és kíméletesebben.

2. Az LLNA-hoz hasonlóan az LLNA: BrdU-ELISA vizsgálat is a bőrszenzibilizáció indukciós fázisát vizsgálja, és a dózis-válasz értékelésére alkalmas mennyiségi adatokat szolgáltat. Emellett azáltal, hogy a bőrszenzibilizáló anyagokat a DNS radioaktív jelölése nélkül lehet kimutatni, a munka során kiküszöbölhető a radioaktivitásnak való kitettség, valamint a hulladék ártalmatlanításának problémája. Ez viszont az egerek nagyobb arányú használatát jelentheti a bőrszenzibilizáló anyagok kimutatására, ami a bőrszenzibilizáló képesség vizsgálata során tovább csökkenthetné a tengerimalacok használatát (pl. B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati irányelve) (13).

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

3. Az alkalmazott fogalmak meghatározása az 1. függelékben található.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

4. Az LLNA: BrdU-ELISA egy módosított LLNA (helyi nyirokcsomó-vizsgálati) módszer, amely bizonyos korlátozások mellett a bőrön túlérzékenységi reakciót kiváltó vegyi anyagok azonosítására szolgál. Ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy az LLNA vagy a tengerimalac-vizsgálat (lásd B.6. fejezet, az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (13) helyett minden esetben az LLNA: BrdU-ELISA-t kell alkalmazni, inkább azt, hogy ez a vizsgálati módszer ugyanolyan hasznos, és olyan alternatív módszerként alkalmazható, amely esetében a pozitív és negatív eredmények általában már nem igényelnek további megerősítést (10) (11). A vizsgálat elvégzése

▼M3

előtt a vizsgáló laboratóriumnak a vizsgált anyagról rendelkezésre álló összes adatot figyelembe kell vennie. Ezen információk közé tartozik a vizsgált anyag azonosítása, kémiai szerkezete, fizikai-kémiai tulajdonságai, valamint a vizsgált anyaggal korábban végzett *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei és a szerkezetileg rokon vegyi anyagok toxikológiai adatai is. Mindezen információk figyelembevételével dönthető el, hogy az LLNA: BrdU-ELISA módszer alkalmazható-e a vizsgált anyag esetében (tekintve, hogy bizonyos vegyianyag-típusoknál inkompatibilitás áll fenn [lásd az 5. bekezdést]), és milyen dózist célszerű választani a vizsgálatokhoz.

5. Az LLNA: BrdU-ELISA *in vivo* módszer, következésképpen nem küszöbölhető ki vele az állatok felhasználása az allergiás kontakt szenzibilizáló hatás vizsgálata során. Ugyanakkor a tengerimalac-vizsgálatokhoz képest (B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) lehetővé teszi az állatok ilyen célú felhasználásának csökkentését (13). Továbbá az állatok kontakt szenzibilizációs vizsgálatok során történő felhasználásának módját tekintve az LLNA: BrdU-ELISA jelentősen kíméletesebb, mivel a B.6. fejezetben és a 406-os OECD vizsgálati irányelvben foglaltakkal ellentétben az LLNA: BrdU-ELISA esetében nincs szükség indukált bőr-hiperszenzitivitási reakciók előidézésére. Továbbá az LLNA: BrdU-ELISA során a tengerimalac-maximizációs vizsgálattal ellentétben nincs szükség adjuváns alkalmazására sem (e melléklet B.6. fejezete, 13). Az LLNA: BrdU-ELISA alkalmazásával tehát csökkenthető az állatok szenvedése. A B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában (13) foglalt módszerrel szembeni előnyei ellenére az LLNA: BrdU-ELISA módszernek vannak bizonyos korlátai, amelyek szükségessé tehetik a B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában foglaltak alkalmazását (pl. bizonyos fémek vizsgálata, álpozitív eredmények bizonyos bőrirritáló anyagokkal [például bizonyos felületaktív anyagokkal] (6) [1, illetve e melléklet B.42. fejezete], vagy a vizsgált anyag oldhatósága). Továbbá az olyan funkcionális csoportokat tartalmazó anyagcsoportok, illetve anyagok, amelyek potenciális zavaró tényezőként szerepelnek (15) szükségessé tehetik a tengerimalac-vizsgálatok (vagyis a B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása (13)) használatát. Az LLNA esetében megállapított korlátozásokat (1, illetve e melléklet B.42. fejezete) az LLNA: BrdU-ELISA módszerre is javasolt alkalmazni (10). E meghatározott hiányosságokon kívül, az LLNA: BrdU-ELISA bármilyen vegyi anyag vizsgálatára megfelelő, kivéve, ha ezek a vegyi anyagok olyan tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek befolyásolják az LLNA: BrdU-ELISA pontosságát. Emellett abban az esetben, ha a stimulációs indexre (SI) kapott érték 1,6 és 1,9 közé esik (lásd a 31–32. bekezdést) figyelembe kell venni a határértéken lévő pozitív eredmények lehetőségét. Ez egy legalább 1,6 értékű stimulációs indexszel rendelkező, 43 anyagot magában foglaló hitelesítési adatbázison alapul (lásd a 6. bekezdést), a mely esetében az LLNA: BrdU-ELISA módszer helyesen azonosította mind a 32, az LLNA módszer szerint szenzibilizáló anyagot, de hibásan azonosított két anyagot az LLNA módszerrel nem szenzibilizálóként meghatározott, 1,6 és 1,9 közötti SI-értékkel (vagyis határértéken lévő pozitív értékkel) rendelkező 11 anyag közül (10). Mivel azonban az SI-értékek beállításához és a vizsgálat prediktív jellemzőinek kiszámításához ugyanazt az adatállományt alkalmazták, a megadott eredmények túlbecsülhetik a valós prediktív jellemzőket.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

6. Az LLNA: BrdU-ELISA módszer hátterében az az alapelv áll, hogy a szenzibilizáló anyagok elsődleges limfocitaproliferációt indukálnak a vizsgált anyag alkalmazási területének nyirokelvezetéséről gondoskodó nyirokcsomókban. Ez a proliferáció arányos az alkalmazott allergén dózisával és erősségével, valamint egyszerű módszert biztosít a szenzibilizáció kvantitatív méréséhez. A proliferációt úgy mérik, hogy az egyes vizsgálati csoportokban mért átlagos proliferációt összehasonlítják a vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportban (VK) mért átlagos proliferációval. Meghatározzák az egyes kezelt csoportokban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportokban mért átlagos proliferáció arányát, amelyet stimulációs indexnek (SI) neveznek, és amelynek legalább $\geq$ 1,6-nek kell lennie ahhoz, hogy indokolt legyen a vizsgált anyag

▼M3

potenciális bőrszenzibilizáló anyagként történő további vizsgálata. Az itt leírt eljárások a BrdU tartalom mérésén alapulnak, amely jelzi az elvezető auriculáris nyirokcsomókban lévő proliferáló sejtek számának növekedését. A BrdU egy timidinanalóg, amely hasonlóan beépül a proliferáló sejtek DNS-ébe. A BrdU beépülését ELISA-val mérjük, amely peroxidázzal is jelölt BrdU-specifikus antitestet alkalmaz. A szubsztrát hozzáadáskor a peroxidáz reakcióba lép a szubsztráttal, és színes termék képződik, amelynek mennyisége meghatározott abszorbancia mellett mikrotiterlemez-leolvasó segítségével mérhető.

A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

7. Ehhez a vizsgálathoz az egér a választandó faj. A LLNA: BrdU-ELISA módszerhez a hitelesítési vizsgálatokat kizárólag a CBA/JN törzzsel végezték, amely ezért preferált törzsnek tekintendő (10) (12). Fiatal felnőtt nullipara és nem vemhes nőstény egereket kell használni. A vizsgálat elején az állatok korának 8-12 hétnek kell lennie, az állatok testtömege között az eltérésnek minimálisnak kell lennie, és a testtömeg nem haladhatja meg az átlagos testtömeg 20 %-át. Ha elegendő adat áll rendelkezésre arra nézve, hogy az LLNA:BrdU-ELISA módszerrel kapott válaszreakcióban nincsenek jelentős törzs- és/vagy ivarspecifikus különbségek, akkor más törzsek, illetve hím állatok is alkalmazhatók.

Az állatok tartásának és etetésének körülményei

8. Az egereket csoportosan kell tartani (16), kivéve, ha az egyedenkénti tartásra megfelelő tudományos indok merül fel. A kísérleti állatok tartásául szolgáló helyiség hőmérsékletének 22 °C ± 3 °C-nak kell lennie. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem haladhatja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos, 12 órás sötét periódusok váltakozásával. Az etetéshez a szokásos laboratóriumi takarmány alkalmazható korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

Az állatok előkészítése

9. Az állatokat véletlenszerűen választják ki, majd egyedi azonosítóval látják el (viszont az állat fülén semmiféle azonosító nem alkalmazható), és a kezelés megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben tartják őket, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez. A kezelés megkezdése előtt minden állatot megvizsgálnak, hogy meggyőződjenek arról, nincs rajtuk látható bőrsérülés.

A dózisok előkészítése

10. A szilárd halmazállapotú vegyi anyagokat az egér fülén történő alkalmazás előtt oldószerben/vivőanyagban kell feloldani vagy szuszpendálni, és szükség esetén hígítani kell. A folyadék halmazállapotú vegyi anyagokat hígítatlanul vagy az adagolás előtt hígított formában lehet alkalmazni. A nem oldható vegyi anyagokat, például az orvosi eszközökben általánosan előforduló anyagokat megfelelő oldószerben történő agresszív extrakciónak kell kitenni, hogy a vizsgálat során az egér fülén való alkalmazás előtt az összes kivonható összetevőt feltárjuk. A vizsgált anyagokat naponta kell elkészíteni, kivéve, ha stabilitási adatok igazolják, hogy a tárolás elfogadható.

A megbízhatóság ellenőrzése

11. A vizsgálat megfelelő teljesítményének megfelelő és reprodukálható szenzitivitással adott válaszreakciókkal történő igazolására pozitív kontrollanyagokat (PK) alkalmaznak; ezek olyan szenzibilizáló tesztanyagok, amelyek esetében a válaszreakció mértéke pontosan meghatározott. Pozitív kontroll párhuzamos vizsgálata ajánlott, mivel ez igazolja, hogy a laboratórium megfelelő szakértelemmel végzi az egyes vizsgálatokat, és lehetővé teszi a laboratóriumon belüli

▼M3

és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság és összehasonlíthatóság értékelését. Néhány szabályozó hatóság szintén előírja a pozitív kontroll minden vizsgálat során történő alkalmazását, ezért az LLNA: BrdU-ELISA módszer elvégzése előtt ajánlott egyeztetni az illetékes hatóságokkal. Ennek megfelelően javasolt a pozitív kontroll rutinszerű párhuzamos vizsgálata, hogy elkerülhetőek legyenek az olyan további állatkísérletek, amelyeket a pozitív kontrollt csak időszakosan alkalmazó laboratórium az előírásoknak való megfelelés érdekében végezne (lásd 12. bekezdés). A pozitív kontrollnak az LLNA: BrdU-ELISA módszerrel olyan expozíciós szint mellett kell pozitív válaszreakciót adnia, amely a negatív kontrollcsoporthoz (NK) képest várhatóan legalább 1,6-del növeli a stimulációs indexet (SI). A pozitív kontroll dózisát úgy kell megválasztani, hogy ne okozzon túlzott bőrirritációt vagy szisztémás toxicitást, és az indukció reprodukálható, de ne túl nagymértékű legyen (például SI > 14 már túlzottnak tekinthető). Az előnyben részesítendő pozitív kontrollanyagok a 25 %-os hexil-cinnemaldehid (CAS-szám: 101-86-0) és a 25 %-os eugenol (CAS-szám: 97-53-0) aceton:olívaolaj (4:1, v/v) arányú keverékében. Adódhatnak olyan körülmények, amelyek fennállásakor, megfelelő indoklás esetén a fenti kritériumoknak megfelelő más pozitív kontrollanyagok is alkalmazhatók.

12. Bár ajánlott a pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata, lehetnek azonban olyan helyzetek, amikor a pozitív kontroll időszakos (például legalább 6 havonta végzett) vizsgálata elfogadható lehet az olyan, az LLNA: BrdU-ELISA vizsgálatot rendszeresen (vagyis legalább havonta egyszeri gyakorisággal) végző laboratóriumok esetében, amelyek rendelkeznek a pozitív kontrollok igazolt, historikus adatbázisával, és ezzel bizonyítható, hogy a laboratórium a pozitív kontrollokkal képes reprodukálható és pontos eredményeket előállítani. Az LLNA: BrdU-ELISA módszerben való jártasság alátámasztható a pozitív kontrollal megfelelő időszakon belül (kevesebb mint egy éve) végzett legalább 10 független vizsgálat során kapott következetesen pozitív eredményekkel.

13. Pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata minden alkalommal szükséges, valahányszor az LLNA: BrdU-ELISA vizsgálati módszerében változtatást hajtanak végre (például a képzett személyzet, a vizsgálati eljárás során használt anyagok és/vagy reagensek, a vizsgálati eszközök, a kísérleti állatok beszerzési forrásának megváltoztatása), és ezeket a változásokat dokumentálni kell a laboratóriumi jelentésekben. Figyelembe kell venni, hogy ezek a változtatások mennyiben befolyásolják a korábban létrehozott historikus adatbázis megfelelőségét, és el kell dönteni, hogy szükséges-e új historikus adatbázis felállítása a pozitív kontroll eredményei következetességének dokumentálása érdekében.

14. A vizsgálatot végző személyeknek tisztában kell lenniük azzal, hogy amennyiben a párhuzamos vizsgálat helyett a pozitív kontrollok időszakos vizsgálata mellett döntenek, ez hatással lehet a pozitív kontrollok időszakos vizsgálatai közötti időszakokban, párhuzamos pozitív kontroll vizsgálata nélkül előállított negatív vizsgálati eredmények megfelelőségére és elfogadhatóságára. Ha például a pozitív kontrollal végzett időszakos vizsgálat álnegatív eredményt adott, akkor megkérdőjelezhetők azok a negatív eredmények, amelyek az utolsó elfogadható eredményű és az elfogadhatatlan eredményű időszakos pozitív kontroll vizsgálat között eltelt időszakban keletkeztek. Az ilyen következmények jelentőségét körültekintően mérlegelni kell annak eldöntésekor, hogy pozitív kontrollokat párhuzamosan vagy csak időszakosan vizsgáljanak-e. Szintén megfontolandó a kevesebb állat használata a párhuzamos pozitív kontrollcsoportban, amennyiben ez tudományosan indokolt, és a laboratóriumra specifikus historikus adatok alapján a laboratórium igazolja, hogy megfelelő a kevesebb egér használata (17).

15. Bár a pozitív kontrollt olyan vivőanyagban kell vizsgálni, amelyről ismert, hogy következetes válaszreakciót vált ki (például aceton:olívaolaj; 4:1, v/v arányú keveréke), lehetnek olyan szabályozási helyzetek, amikor nem szokványos vivőanyagokban (klinikailag/kémiailag releváns készítmény) történő vizsgálat elvégzésére is szükség van (18). Amennyiben a párhuzamos pozitív kontrollt a vizsgált anyagétól eltérő vivőanyagban vizsgálják, akkor a párhuzamos pozitív kontrollal együtt egy külön vivőanyagos kontrollt is vizsgálni kell.

▼M3

16. Azokban az estekben, amikor egy bizonyos vegyi csoportba tartozó vizsgált anyagokat vagy a válaszreakciók tartományát értékelik, szintén hasznos lehet a referenciaanyagok alkalmazása annak igazolására, hogy a vizsgálati módszer megfelelően működik az ilyen típusú vizsgált anyagok bőrszenzibilizáló hatásának kimutatására. A megfelelő referenciaanyagoknak a következő tulajdonságokkal kell rendelkezniük:

— szerkezeti és funkcionális hasonlóság a vizsgált anyag csoportjával,

— ismert fizikai/kémiai tulajdonságok,

— az LLNA: BrdU-ELISA módszerrel kapott alátámasztó adatok,

— egyéb állatmodellekből és/vagy emberből származó alátámasztó adatok.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

Az állatok száma és a dózisszintek

17. Minden dóziscsoportban legalább négy állatot kell használni, és a vizsgált anyagból legalább három különböző koncentrációt, továbbá párhuzamos negatív kontrollcsoportot, amelyet csak a vizsgált anyaghoz használt vivőanyaggal kezelnek, valamint egy pozitív kontroll csoportot kell alkalmazni (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11–15. bekezdésben foglaltakat). Megfontolandó a pozitív kontroll többféle dózisának vizsgálata, különösen, ha a pozitív kontroll vizsgálatát időszakosan végzik. A kontrollcsoportban lévő állatokkal ugyanúgy kell bánni és dolgozni, mint a kezelt csoportokban lévőkkel, azzal a kivétellel, hogy az állatokat nem kezelik a vizsgált anyaggal.

18. A dózist és a vivőanyagot a 2. és 19. számú hivatkozásokban megadott ajánlások alapján kell kiválasztani. Az egymás utáni dózisok kiválasztása általában megfelelő koncentrációsorból, például 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % stb. történik. Az alkalmazott koncentrációsort megfelelő tudományos megfontolások alapján kell kiválasztani. A három egymás utáni koncentráció kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált anyagról esetlegesen rendelkezésre álló valamennyi toxikológiai információt (például akut toxicitás és bőrirritáció), valamint szerkezeti és fizikokémiai adatot, hogy a legmagasabb koncentrációval a lehető legnagyobb expozíciót idézzük elő, amely még nem okoz szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű lokális bőrirritációt (19) (20, illetve e melléklet B.4. fejezete). Ilyen jellegű információk hiányában szükséges lehet a megelőző előszűrő vizsgálat (lásd a 21–24. bekezdést).

19. A vivőanyagnak nem szabad megzavarnia vagy befolyásolnia a vizsgálat eredményét, és aszerint kell kiválasztani, hogy a vizsgált anyag oldhatósága a lehető legnagyobb koncentráció elérése érdekében maximális legyen, ugyanakkor a vizsgált anyag felvitelére alkalmas oldatot/szuszpenziót kapjunk. A javasolt vivőanyagok az aceton:olívaolaj (4:1 v/v) keveréke, N,N-dimetilformamid, metil-etil-keton, propilén-glikol és dimetil-szulfoxid (6), de megfelelő tudományos indoklás esetén más vivőanyagok is alkalmazhatók. Bizonyos esetekben további kontrollként szükséges lehet valamely klinikai szempontból releváns oldószer használata, vagy annak a kereskedelmi formulának az alkalmazása, amelyben a vizsgált anyagot forgalomba hozzák. Különösen vigyázni kell arra, hogy megfelelő szolubilizáló szerek (pl. 1 % Pluronic® L92) alkalmazásával a hidrofil vizsgált anyagokat olyan vivőanyagrendszerbe építsük be, amely benedvesíti a bőrt, de nem folyik le azonnal. A teljesen vizes alapú vivőanyagokat tehát kerülni kell.

▼M3

20. A nyirokcsomók egyedenként történő feldolgozása lehetővé teszi az egyedek közötti variabilitás, valamint a vizsgált anyaggal és a vivőanyaggal kezelt csoport eredményeinek statisztikai összehasonlítását (lásd a 33. bekezdést). Emellett csak akkor lehet értékelni, hogy lehetséges-e csökkenteni a pozitív kontrollcsoportban lévő egerek számát, ha az egyedi állatokra vonatkozóan gyűjtünk adatokat (17). Ezen túlmenően, egyes szabályozó hatóságok is megkövetelik az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtést. Az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtés rendszeresítése állatjóléti előnyökkel jár azáltal, hogy elkerülhető a vizsgálatok megismétlése abban az esetben, amikor a vizsgált anyagról eredetileg csak egyféleképpen gyűjtötték az adatokat (pl. összevont állatkísérletes adatok), míg a szabályozó hatóság később eltérő követelményeket állít fel (pl. egyedi állatokon alapuló adatok).

Előszűrő vizsgálat

21. A legmagasabb vizsgálandó dózis meghatározását lehetővé tevő információ hiányában (lásd a 18. bekezdést) az LLNA: BrdU-ELISA módszerhez alkalmazandó megfelelő dózisszint megállapítása érdekében előszűrő vizsgálatot kell végezni. Az előszűrő vizsgálat célja, hogy támpontot adjon az LLNA: BrdU-ELISA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózis kiválasztásához, amennyiben a szisztémás toxicitást (lásd a 24. bekezdést) és/vagy nagyfokú bőrirritációt (lásd a 23. bekezdést) okozó koncentrációra vonatkozó információk nem állnak rendelkezésre. Folyadékok esetében a legmagasabb vizsgált dózisnak 100 %-os koncentrációnak kell lennie, szilárd anyagok vagy szuszpenziók esetében pedig a lehetséges maximális koncentrációnak.

22. Az előszűrő vizsgálatot a fő LLNA: BrdU-ELISA vizsgálathoz hasonló körülmények között kell végezni, eltekintve attól, hogy nem kell a nyirokcsomó-proliferációt értékelni, valamint dóziscsoportonként kevesebb állat használható. Dóziscsoportonként egy vagy két állat javasolt. Az egereket a szisztémás toxicitás, illetve az alkalmazás helyén fellépő helyi irritáció jeleinek szempontjából naponta megfigyelik. A testtömeget a vizsgálat előtt és az állat exterminálása előtt is (6. nap) feljegyzik. A bőrpírt az egerek mindkét fülén vizsgálják és pontozzák az 1. táblázat (20, illetve e melléklet B.4. fejezete) szerint. A fülvastagság értékeit egy vastagságmérővel (például digitális mikrométer, vagy Peacock Dial vastagságmérő) állapítják meg az 1. napon (az adagolás előtt), a 3. napon (hozzávetőleg 48 órával az első dózis után), valamint a 6. napon. A 6. napon a fülvastagságot ezen kívül a fülből lyukasztással eltávolított szövet tömegének meghatározásával is meg lehet állapítani, amit az állat exterminálása után kell elvégezni. Nagyfokú helyi irritációnak minősül a legalább ≥ 3-as pontszámú bőrpír és/vagy legalább ≥ 25 %-os fülvastagság a vizsgálat bármely napján (21) (22). A fő LLNA: BrdU-ELISA vizsgálathoz azt a dózist kell maximális dózisként választani, amely az előszűrés során alkalmazott koncentrációsorban (lásd a 18. bekezdést) a szisztémás toxicitást és/vagy nagyfokú helyi bőrirritációt okozó koncentrációnál eggyel alacsonyabb.

1. táblázat

Bőrpír (erythema) pontszámai

Megfigyelés	Pontszám
Nincs erythema	0
Nagyon enyhe erythema (alig észlelhető)	1
Jól körülírt erythema	2

▼M3

Megfigyelés	Pontszám
Közepes-súlyos erythema	3
Súlyos (céklavörös elszíneződés), pörkképződéig terjedő erythema, amely lehetetlenné teszi az erythema besorolását	4

23. A 25 %-os fülvastagság-növekedésen felül (21) (22), a bőrirritáló anyagok LLNA módszerrel végzett kimutatásához a kezelt állatok fülvastagságának kontrollcsoporthoz viszonyított statisztikailag szignifikáns növekedését is használják (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Noha 25 % alatti fülvastagság esetén előfordulhat statisztikailag szignifikáns növekedés, a nagyfokú irritációval azonban ezt különösen nem hozták összefüggésbe (25) (26) (27) (28) (29).

24. Az integrált értékelés részeként alkalmazva a következő klinikai tünetek jelezhetnek szisztémás toxicitást (30), és ezáltal kijelölhetik a fő LLNA:BrdU-ELISA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózist: az idegrendszer működésében bekövetkező változások (például piloerekció, ataxia, tremorok és görcsrohamok); a viselkedésben bekövetkező változások (például agresszivitás, a tisztálkodási tevékenységekben bekövetkező változás, az aktivitási szint jelentős változása); a légzési mintázat változása (például a légvételek gyakoriságában és az intenzitásában bekövetkező változás, úgymint dyspnoe, zihálás és szörtyzörejek), valamint változások az táplálék- és vízfogyasztásban. Az értékelés során emellett figyelembe kell venni a letargia és/vagy reakciókészség hiányának jeleit, valamint az enyhénél és pillanatnyinál fokozottabb fájdalom vagy szenvedés bármilyen klinikai tünetét, az > 5 %-nál nagyobb arányú testtömegcsökkenést az 1. naptól a 6. napig tartó időszakban, valamint a mortalitást. Az elhullásközeli állapotban lévõ vagy súlyos fájdalmak és szenvedés jeleit mutató állatokat humánus módon exterminálni kell (31).

A fő vizsgálat kísérleti ütemterve

25. A vizsgálat kísérleti ütemterve a következő:

— *1. nap:* Külön meg kell határozni, és fel kell jegyezni mindegyik állat testtömegét és az esetleges klinikai megfigyeléseket. Vigyünk fel 25 µl térfogatú, megfelelő hígítású vizsgált anyagot, valamint a vivőanyagot önmagában vagy pozitív kontrollt (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11–15. bekezdésekben foglaltakat) a fülek dorzális oldalára.

— *2. és 3. nap:* Ismételjük meg az 1. napon elvégzett felviteli eljárást.

— *4. nap:* Nincs kezelés.

— *5. nap:* Fecskendezzünk be 0,5 mL (5 mg/egér) BrdU (10 mg/ml) oldatot intraperitoneálisan.

— *6. nap:* Fel kell jegyezni minden állat testtömegét és minden klinikai megfigyelést. A BrdU befecskendezése után körülbelül 24 órával (24 h) exterminájuk az állatokat. Mindegyik egér füléből vágjuk ki a kezelt terület nyirokelvezetéséről gondoskodó füli nyirokcsomókat, és tegyük be azokat állatonként külön-külön foszfáttal pufferelt sóoldatba (PBS). A nyirokcsomók azonosításának és preparálásának részletei és az ehhez kapcsolódó ábrák a (17) hivatkozásban találhatók. A helyi bőrreakció fő vizsgálatban történő további monitorozásához olyan további paramétereket lehet belevenni a vizsgálati protokollba, mint például a bőrpír pontozása vagy a fülvastagság mérése (akár vastagságmérővel, akár elölés utáni füldarabsúly-meghatározással).

▼M3

A sejtszuszpenziók elkészítése

26. Az egyes állatokból két oldalról vett nyirokcsomósejtekből (LNC) egysejtszuszpenziót kell készíteni a sejtek mechanikus úton történő óvatos szétválasztásával, amely végezhető 200 mikrométeres lyukméretű rozsdamentes acélból készült fémhálóval vagy egyéb elfogadható módszerrel (pl. a nyirokcsomók egyszer használatos műanyag mozsárban történő összetörése, majd 70-es nejlonhálón való átpréselése). Az LNC szuszpenzió elkészítése a vizsgálat szempontjából döntő fontosságú, ezért a módszert a vizsgálatot végző valamennyi munkatársnak előre el kell sajátítani. A negatív kontrollként szolgáló állatok nyirokcsomói kisméretűek, ezért az SI-értékre gyakorolt mesterséges hatások elkerülése érdekében fontos az elővigyázatos kezelés. Az LNC szuszpenzió céltérfogatát minden esetben a meghatározott optimalizált térfogathoz kell igazítani (körülbelül 15 ml). Az optimális térfogat meghatározása a negatív kontrollcsoport 0,1–0,2 közötti átlagos abszorbanciájának elérésén alapul.

A sejtproliferáció meghatározása (a BrdU limfociták DNS-ébe való beépülésének mérése)

27. A BrdU mérése a kereskedelemben kapható ELISA készlet (például Roche Applied Science, Mannheim, Németország, katalógusszám: 11 647 229 001) használatával történik. A mérés lényege, hogy az LNC-szuszpenzióból három adagban 100 µl-t kell egy lapos aljú mikrotiterlemez mélyedéseibe adagolni. Az LNC fixálása és denaturálása után mindegyik mélyedésbe anti-BrdU-antitestet kell adni, majd várni kell, hogy a reakció kialakuljon. Ezután az anti-BrdU antitestet mosással el kell távolítani, majd hozzá kell adni a szubsztrátoldatot, és várni kell, hogy kialakuljon a kromogén termék. Ekkor 370 nm-en 492 nm-es referencia-hullámhossz mellett mérni kell az abszorbanciát. A vizsgálati körülményeket minden esetben optimalizálni kell (lásd a 26. bekezdést).

MEGFIGYELÉSEK

Klinikai megfigyelések

28. Naponta legalább egyszer minden egérnél meg kell vizsgálni az alkalmazás helyén kialakuló lokális vagy szisztémás toxicitás esetleges tüneteit. Minden megfigyelést szisztematikusan fel kell jegyezni minden egyes egér esetében, egyedi adatsor felvételével. A monitoring tervnek tartalmaznia kell azon kritériumokat, amelyek alapján azonnal azonosíthatóak az eutanáziát igénylő, szisztémás toxicitást, kiterjedt helyi bőrirritációt vagy bőrkorróziót mutató egerek (31).

Testtömeg

29. Ahogyan az a 25. bekezdésben szerepel, az egyes állatok testtömegét a vizsgálat kezdetén, valamint a humánusan történő exterminálás tervezett időpontjában kell megmérni.

AZ EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

30. Az egyes kezelési csoportokra vonatkozó eredményeket átlagos stimulációs indexben (SI) fejezzük ki. Az SI kiszámítása úgy történik, hogy a vizsgált anyaggal kezelt egyes csoportokban és a pozitív kontrollcsoportban kapott állatonkénti átlagos BrdU jelölési indexet el kell osztani az oldószerrel/vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport átlagos BrdU jelölési indexével. A vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportok átlagos SI-értéke tehát 1.

A BrdU jelölési index meghatározása:

$$\text{BrdU jelölési index} = (ABS_{em} - ABS\ vak_{em}) - (ABS_{ref} - ABS\ vak_{ref})$$

em = kibocsátott hullámhossz; ref = referencia hullámhossz.

▼M3

31. A válaszreakciót akkor lehet pozitívan értékelni, ha a stimulációs index ≥ 1,6 (10). Amikor azonban azt kell meghatározni, hogy egy határértéken lévő eredmény (vagyis amikor az SI-érték 1,6 és 1,9 között van) pozitívnak tekintendő-e, akkor a dózis-válasz összefüggés erőssége, a statisztikai szignifikancia és az oldószerrel/vivőanyaggal, valamint a pozitív kontrollal kapott válaszreakciók következetessége is felhasználható (3) (6) (32).

32. Az 1,6 és 1,9 közötti SI-vel járó, határértéken lévő pozitív válaszreakciók esetében a felhasználók dönthetnek úgy, hogy az eredmények pozitivitásának megerősítéséhez további információkat – például a dózis-válasz összefüggést, szisztémás toxicitás vagy nagyfokú irritáció jelét, illetve adott esetben a statisztikai szignifikanciát az SI értékekkel együtt – kívánnak figyelembe venni (10). Figyelembe kell venni a vizsgált anyag különféle tulajdonságait is, köztük azt, hogy mutat-e szerkezeti rokonságot ismert bőrszenzibilizáló anyagokkal, okoz-e nagyfokú bőrirritációt egereknél, illetve a megfigyelt dózis-válasz összefüggés jellegét. Ezek, illetve további megfontolások részletesebb tárgyalását lásd a (4) hivatkozásban.

33. Az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtés lehetővé teszi a dózis-válasz összefüggés adatokban tükröződő fennállásának és mértékének statisztikai elemzését. Bármely statisztikai elemzés tartalmazhatja a dózis-válasz összefüggés értékelését, valamint a vizsgálati csoportok megfelelően korrigált összehasonlításait (például a dóziscsoportok páronkénti összehasonlítása a párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollcsoportokkal). A statisztikai elemzésekben a dózis-válasz tendenciák értékelésénél szerepelhet például lineáris regresszió vagy William-féle próba, a páronkénti összehasonlításoknál pedig Dunnett-féle próba. A megfelelő statisztikai elemzési módszer kiválasztásakor a vizsgálónak figyelemmel kell lennie a lehetséges varianciaegyenlőtlenségekre és más kapcsolódó problémákra, amelyek miatt az adatok transzformációjára vagy nem paraméteres statisztikai elemzésre lehet szükség. A vizsgálónak minden esetben el kell végeznie az SI-k kiszámítását és statisztikai elemzéseket bizonyos adatpontokkal (az úgynevezett „kiugró adatokkal”) és azok nélkül.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

34. Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, feltüntetve az egyedi állatok BrdU jelölési indexének értékeit, a csoport átlagos BrdU jelölés/állat értékét, a hozzá tartozó hibamutatóval (például SD, SEM), valamint az egyes dóziscsoportokban kapott átlagos stimulációs indexeket (SI) összehasonlítva a párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollcsoportéval.

Vizsgálati jelentés

35. A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyagok és kontrollanyagok:

— azonosító adatok (pl. adott esetben a CAS-szám és az EU-szám; eredet; tisztaság; ismert szennyezők; tételszám),

— fizikai megjelenés és fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. illékonyság, stabilitás, oldhatóság),

— elegy esetén annak összetétele és az egyes komponensek egymáshoz viszonyított aránya,

Oldószer/vivőanyag:

— azonosító adatok (adott esetben tisztaság; koncentráció; alkalmazott térfogat),

— a vivőanyag kiválasztásának indoklása,

▼M3

Kísérleti állatok:

— CBA egértörzs származása,

— az állatok mikrobiológiai státusa, amennyiben ismert,

— az állatok száma és életkora,

— az állatok származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.,

Vizsgálati körülmények:

— az ELISA készlet esetében a származás, a tételszám, a gyártó minőségbiztosítási/minőség-ellenőrzési adatai (antitest szenzitivitása és specificitása, illetve a kimutatási határ),

— a vizsgált anyagból előállított készítménnyel és annak alkalmazásával kapcsolatos adatok,

— a dózisszintek megválasztásának indoklása (ezen belül adott esetben az előszűrési vizsgálatok eredményei),

— a vivőanyag és a vizsgált anyag alkalmazott koncentrációja, valamint a vizsgált anyagból alkalmazott teljes mennyiség,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány típusa/eredete, a víz eredete),

— a kezelés adatai és a mintavételek ütemezése,

— a toxicitás mérésére alkalmazott módszerek,

— a pozitív és negatív vizsgálati eredmény kimondásának kritériumai,

— a protokolltól való esetleges eltérések adatai, és annak kifejtése, hogy az eltérés hogyan érintheti vizsgálati tervet és az eredményeket,

A megbízhatóság ellenőrzése:

— a legutóbbi megbízhatósági ellenőrzés eredményeinek összefoglalása az alkalmazott anyag, koncentráció és vivőanyag adataival együtt,

— a vizsgálólaboratórium párhuzamosan és/vagy korábban vizsgált pozitív és párhuzamosan vizsgált negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollokra vonatkozó adatai,

— ha nem vizsgáltak párhuzamosan pozitív kontrollt, a laboratóriumban legutóbb végzett időszakos pozitív kontroll dátuma és laboratóriumi jelentése, valamint pozitív kontroll vizsgálatának korábbi adatait részletező jelentés, amely indokolja, hogy miért nem végzik a laboratóriumban pozitív kontroll párhuzamos vizsgálatát,

Eredmények:

— az egyes állatok testtömege a kezelés kezdetén és a humánusan történő exterminálás tervezett időpontjában, illetve az átlagos és vonatkozó hibamutatók (pl. SD, SEM) kezelési csoportonként,

— a toxicitási tünetek, ezen belül az alkalmazás helyén esetleg kialakuló bőrirritáció megjelenésének időpontja és időbeli alakulása minden egyes állatra vonatkozóan, amennyiben volt ilyen,

— az állatonkénti BrdU jelölési indexek és kezelési csoportonkénti SI értékek táblázata,

— átlagos és kapcsolódó hibamutatók (pl. SD, SEM) az állatonkénti BrdU jelölési index esetében, az egyes kezelés csoportokban, és a kiugró értékek elemzése az egyes kezelési csoportokban,

▼M3

— a kiszámított SI és a variabilitás megfelelő mutatója, amely az egyedek közti variabilitást a vizsgált anyaggal kezelt csoportban és a kontrollcsoportokban egyaránt figyelembe veszi,

— dózis-válasz összefüggés,

— adott esetben statisztikai elemzések,

Az eredmények tárgyalása:

— rövid kommentár az eredményekhez, a dózis-válasz elemzéshez és adott esetben a statisztikai elemzésekhez, és következtetés levonása arra vonatkozóan, hogy a vizsgált anyagot bőrszenzibilizáló hatásúnak kell-e tekinteni vagy sem.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban:

[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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563-79.

(33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: A vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezés” megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (33).

Referenciaanyag: A vizsgált anyaggal való összehasonlítás céljából etalonként használt szenzibilizáló vagy nem szenzibilizáló anyag. A referenciaanyaggal szemben a következő elvárások fogalmazhatók meg: i. állandó és megbízható beszerzési forrásból vagy forrásokból kell származnia; ii. a vizsgált anyagok csoportjához hasonló szerkezettel és funkcionális jellemzőkkel kell rendelkeznie; iii. ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; iv. rendelkezésre kell állniuk az anyag ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és v. a kívánt válaszreakciók tartományában ismert hatásúnak kell lennie.

Álnegatív eredmény: Valamely vizsgálati módszerrel tévesen negatívnak vagy inaktívnak minősített vizsgált anyag, amely valójában pozitív vagy aktív (33).

Álpozitív: Valamely vizsgálattal tévesen pozitívnak vagy aktívnak minősített vizsgált anyag, amely valójában negatív vagy inaktív (33).

Veszély: Káros egészségügyi vagy ökológiai hatások előidézésének lehetősége. A káros hatás csak akkor jelenik meg, ha kellő szintű az expozíció.

Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság: Annak mértéke, hogy a különböző minősített laboratóriumok azonos protokoll és azonos vizsgált anyag alkalmazásával mennyire képesek minőségileg és mennyiségileg azonos eredményeket produkálni. A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság az előhitelesítési és hitelesítési folyamat során kerül meghatározásra, és annak mértékét jelzi, hogy az adott vizsgálat mennyire sikeresen vihető át laboratóriumok között; más néven laboratóriumok közötti megismételhetőség (33).

Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság: Annak meghatározása, hogy az ugyanazon laboratóriumban dolgozó képzett személyek meghatározott protokoll különböző időpontokban történő alkalmazásával mennyire sikeresen tudják reprodukálni az eredményeket. Más néven laboratóriumon belüli megismételhetőség (33).

Kiugró érték: A kiugró érték olyan megfigyelés, amely szembetűnően eltér az egy populációból vett véletlenszerű minta egyéb értékeitől.

Minőségbiztosítás: Irányítási folyamat, amelynek során a laboratóriumi vizsgálati szabványok és követelmények betartását, a jegyzőkönyvek vezetését, valamint az adattovábbítás pontosságát a vizsgálatot végző személyektől független személyek ellenőrzik.

Megbízhatóság: Azonos protokoll szerint végzett vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóságának mérésére szolgál. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (33).

Bőrszenzibilizáció: Immunológiai folyamat, amely akkor jelentkezik, ha egy érzékeny egyén lokálisan érintkezik valamely indukáló hatású allergén vegyi anyaggal, amely esetlegesen kontakt szenzibilizáció kialakulásához vezető immunválaszt vált ki a bőrben.

Stimulációs index (SI): Adott vizsgált anyag bőrszenzibilizációt okozó képességének meghatározására kiszámított érték, amely az anyaggal kezelt csoportban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportban tapasztalt proliferáció aránya.

Vizsgált anyag (más néven vizsgált vegyi anyag): Bármilyen anyag vagy keverék, amelyet ezzel a vizsgálati módszerrel vizsgálnak.

▼M4

B.52. AKUT INHALÁCIÓS TOXICITÁS – AKUT TOXIKUS OSZTÁLY MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 436. vizsgálati iránymutatásban (2009) leírt módszerrel. Az akut inhalációs toxicitásra vonatkozó első 403. vizsgálati iránymutatást 1981-ben fogadták el, és azóta felülvizsgálták (lásd e melléklet B.2. fejezetét (1)). Az inhalációs akut toxikus osztály (ATC) módszer (2) (3) (4) kidolgozását helyénvalónak ítélték a felülvizsgált orális ATC módszer elfogadását követően (a e B.1b. fejezete) (5). Az ATC vizsgálati módszer akut inhalációs toxicitásra vonatkozó visszamenőleges teljesítmény-értékelésének eredménye azt mutatta, hogy a módszer megfelelő az osztályozási és címkézési célból történő használatra (6). Az inhalációs ATC vizsgálati módszer rögzített célkoncentrációk melletti sorozatos, lépésenkénti vizsgálatot tesz lehetővé a vizsgált vegyi anyag toxicitásának besorolása céljából. A letalitás kulcsfontosságú végpont, azonban a súlyos fájdalom vagy szorongás jeleit mutató, szenvedő vagy elhullásközeli állapotban lévő állatokat humánus módon el kell pusztítani a szenvedés minimalizálása érdekében. A humánus végpontokra vonatkozóan az OECD 19. iránymutatásában (7) található útmutatás.

2. A jelen vizsgálati módszer szerinti vizsgálatok végrehajtásához és értelmezéséhez az akut inhalációs toxicitási vizsgálatokra vonatkozó (39. számú) iránymutatás (8) nyújt útmutatást.

3. Az e vizsgálati módszer összefüggésében alkalmazott fogalmak meghatározása az 1. függelékben, valamint a 39. iránymutatásban (8) található.

4. A jelen vizsgálati módszer információkat szolgáltat a veszélyes tulajdonságokról, és lehetővé teszi a vizsgált vegyi anyagnak az akut toxicitást okozó vegyi anyagok osztályozására vonatkozó 1272/2008/EK rendelet (9) szerinti besorolását és osztályozását. Abban az esetben, ha az LC_{50} értékek pontbecslése vagy a koncentráció-válasz összefüggés elemzése szükséges, az e melléklet B.2. fejezetében leírt vizsgálati módszert kell alkalmazni (1). A vizsgálati módszer kiválasztására vonatkozó további útmutatás a 39. iránymutatásban (8) található. A jelen vizsgálati módszer nem kifejezetten különleges anyagok – például alacsony oldhatóságú izometrikus vagy rostos anyagok, vagy mesterséges nanoanyagok – vizsgálatára szolgál.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

5. A jelen vizsgálati módszer szerinti vizsgálat alkalmazásának mérlegelése előtt a vizsgálati laboratóriumnak az állatkísérletek minimalizálása érdekében figyelembe kell vennie minden, a vizsgált vegyi anyagról rendelkezésre álló információt, beleértve az olyan, meglévő tanulmányokat, amelyek adatai a további vizsgálatok elvégzésének mellőzését támasztják alá. A legalkalmasabb faj, törzs, nem, expozíciós mód és a megfelelő vizsgálati koncentráció kiválasztását esetlegesen segítő információk közé tartozik a vizsgált vegyi anyag azonossága, kémiai szerkezete, valamint fizikai és kémiai tulajdonságai, az esetleges *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei, a várható felhasználási terület(ek) és a humán expozíció lehetősége, a szerkezetileg rokon vegyi anyagokról rendelkezésre álló (Q)SAR- és toxikológiai adatok. A maró ([1]) vagy súlyosan irritáló hatásuk miatt várhatóan súlyos fájdalmat vagy szorongást okozó koncentrációk jelen vizsgálati módszerrel való vizsgálata nem javasolt (lásd a 39. iránymutatást (8)).

([1]) A maró hatás értékelése egyebek között az alábbi bizonyítékokat felhasználó szakértői véleményen alapulhat: emberekkel és állatokkal kapcsolatos tapasztalatok, rendelkezésre álló (*in vitro)* adatok, például a jelen melléklet B.40. (10), B.40a. fejezete (11), vagy az OECD 435. iránymutatása (12), pH-értékek, hasonló vegyszerekkel kapcsolatos információk vagy bármely más vonatkozó adat.

▼M4

A VIZSGÁLAT ELVE

6. A progresszív eljáráson alapuló vizsgálat elve, hogy a 4 órás expozíciós időszak alatt elegendő információt szerezzünk a vizsgált vegyi anyag akut inhalációs toxicitására vonatkozóan a vizsgált vegyi anyag osztályozásának lehetővé tétele érdekében. Meghatározott szabályozási célok elérése érdekében más expozíciós időtartamok is alkalmazhatók. A lépésenként változó koncentráció bejuttatásának minden meghatározott szakaszában nemenként 3 állatot kell vizsgálni. Az elhullási aránytól és/vagy az állatok elhullásközeli állapotától függően 2 lépés elegendő lehet a vizsgált vegyi anyag akut toxicitásának megítéléséhez. Ha bizonyítható, hogy az egyik nem érzékenyebb a vizsgált anyagra, mint a másik, a vizsgálat folytatható csak az érzékenyebb nemmel. Az előző lépés eredménye meghatározza a következő lépést, az alábbiak szerint:

   a) nincs szükség további vizsgálatra;

   b) nemenként 3 állat vizsgálata szükséges; vagy

   c) 6 állat vizsgálata szükséges csak az érzékenyebb nemből, azaz a toxikus osztály becsült alsó határainak vizsgált koncentrációs csoportonként nemtől függetlenül 6 állaton kell alapulniuk.

7. Az elhullásközeli állapotban lévő, nyilvánvalóan fájdalmakkal küszködő vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutató állatokat humánus módon el kell pusztítani, és a vizsgálat eredményeinek értelmezésekor a vizsgálat során elhullott állatokkal azonos módon kell figyelembe venni. A megjósolható vagy közeli elhullás felismerését segítő iránymutatás, valamint az elhullás közelében lévő vagy súlyosan szenvedő állatok elpusztítására vonatkozó döntési kritériumok a humánus végpontokról szóló 19. iránymutatásban (7) találhatók.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

8. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal, ivarérett állatokat kell alkalmazni. A javasolt állatfaj a patkány, más faj használata esetén a döntést indokolni kell.

Az állatok előkészítése

9. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. Az expozíció napján az állatoknak 8–12 hetes fiatal, ivarérett egyedeknek kell lenniük, a testsúlyuk pedig a korábbi expozíciókkal érintett, azonos életkorú állatok nemenkénti átlagos testsúlyától legfeljebb ± 20 %-kal térhet el. Az állatokat véletlenszerűen kell kiválasztani, egyedi azonosítás céljából meg kell jelölni azokat. Az állatokat a laboratóriumi körülményekhez való szoktatás céljából a vizsgálat megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben tartjuk. Az állatokat a vizsgálatot megelőzően rövid ideig szoktatni kell a vizsgálati eszközökhöz, mivel ezzel csökkenthető az új környezet okozta stressz.

Az állatok tartása

10. A kísérleti állatok tartására használt helyiség hőmérséklete 22 ± 3 °C kell, hogy legyen. A relatív páratartalmat ideális esetben 30–70 %-os tartományban kell tartani, ugyanakkor ez nem feltétlenül lehetséges, ha vivőanyagként vizet használnak. Az expozíció előtt és után az állatokat általában nemek és koncentrációk szerinti csoportokban kell a ketreceikben elhelyezni, azonban az állatok ketrecenkénti számának nem szabad akadályoznia az egyes állatok megfigyelését, és minimalizálnia kell a kannibalizmus és a marakodás okozta veszteségeket. Ha az állatok expozíciója csak orron át történik, szükséges lehet szoktatni azokat a lefogásukra szolgáló csövekhez. Az állatok lefogására szolgáló csövek nem okozhatnak az állatoknak indokolatlan fizikai, termális vagy a mozgásképtelenség okozta stresszt. A lefogás hatással lehet olyan fiziológiai végpontokra, mint a testhőmérséklet

▼M4

(hipertermia) és/vagy a percenkénti légzésvolumen. Amennyiben a rendelkezésre álló általános adatok azt igazolják, hogy ilyen változások nem lépnek fel számottevő mértékben, az állatok lefogására szolgáló csövekhez való előzetes szoktatás mellőzhető. Az aeroszoloknak egész testfelületükön kitett állatokat az expozíció során külön ketrecben kell elhelyezni, hogy a vizsgált aeroszol ne szűrődhessen át a többi állat szőrzetén. Hagyományos és minősített laboratóriumi takarmány alkalmazható – kivéve az expozíció időtartama alatt –, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást.

Inhalációs kamrák

11. Az inhalációs kamra kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált vegyi anyag jellegét és a vizsgálat célját. Az előnyben részesítendő expozíciós mód a csak orron keresztüli expozíció (ez magában foglalja a csak a fejet, orrot vagy szájat érintő expozíciót). A csak orron keresztüli expozíció általában előnyben részesítendő a folyékony vagy szilárd aeroszolok, valamint a lecsapódva esetlegesen aeroszolt alkotó gőzök vizsgálata esetén. Előfordulhat, hogy a vizsgálat különleges céljai egész testfelületen keresztüli expozíció alkalmazásával hatékonyabban elérhetők, ezt azonban indokolni kell a vizsgálati jegyzőkönyvben. Egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamra használata esetén a légköri stabilitás biztosítása érdekében a vizsgált állatok össztérfogata nem haladhatja meg a kamra térfogatának 5 %-át. A csak orron át történő és az egész testfelületen keresztüli expozíciós technikák elveit, valamint azok különös előnyeit és hátrányait a 39. iránymutatás (8) ismerteti.

EXPOZÍCIÓS KÖRÜLMÉNYEK

A koncentrációk beadása

12. Az expozíció javasolt időtartama négy óra, amelybe nem tartozik bele az egyensúlyi állapot eléréséhez szükséges időtartam. Meghatározott követelmények teljesítése érdekében ettől eltérő időtartamok alkalmazása lehet szükséges, ezt azonban a vizsgálati jegyzőkönyvben indokolni kell (lásd a 39. iránymutatást (8)). Az anyagnak egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamrában kitett állatokat külön ketrecben kell tartani, hogy az állatok egymás tisztogatása során ne nyelhessék le a vizsgált vegyi anyagot. Az expozíció időtartama alatt az állatok nem kaphatnak takarmányt. Az állatoknak víz az egész testfelületen keresztüli expozíció teljes időtartama alatt adható.

13. Az állatokat gáz, gőz, aeroszol vagy ezek keveréke formájában tesszük ki a vizsgált vegyi anyagnak. A vizsgálandó halmazállapot a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, a kiválasztott koncentrációtól és/vagy a vizsgált vegyi anyag kezelése és használata során legnagyobb valószínűséggel előforduló halmazállapottól függ. A higroszkopikus és kémiailag reakcióképes vizsgált vegyi anyagokat száraz levegős körülmények között kell vizsgálni. Ügyelni kell a robbanékony koncentrációk keletkezésének elkerülésére.

Részecskeméret-eloszlás

14. Minden aeroszol, valamint a lecsapódva esetlegesen aeroszolt alkotó gőzök esetén részecskeméretezést kell végezni. A légzőrendszer összes lényeges részének expozíciója érdekében 1 és 4 μm közötti tömegfelező aerodinamikai átmérővel (MMAD) rendelkező, az 1,5 és 3,0 közötti tartományba eső geometriai szórású (σ_g) aeroszolok használata javasolt (8) (13) (14). Habár ésszerű keretek között törekedni kell az e szabványnak való megfelelésre, szakértői megítélésre kell hagyatkozni, ha erre nincs lehetőség. A fémgőzök részecskéi például kisebbek lehetnek e szabványos méretnél, míg a töltéssel rendelkező részecskék, a rostok és a higroszkopikus anyagok (amelyek részecskeméretе a légzőrendszer nedves környezetében nő) meghaladhatják azt.

▼M4

A vizsgált vegyi anyag előkészítése vivőanyagban

15. A vizsgált vegyi anyag megfelelő légköri koncentrációjának és részecskeméretének eléréséhez vivőanyag alkalmazható. Főszabályként a víz részesítendő előnyben. A részecskéket képző anyagok mechanikai eljárásoknak vethetők alá a szükséges részecskeméret-eloszlás elérése érdekében, ugyanakkor ügyelni kell arra, hogy a vizsgált vegyi anyag ne induljon bomlásnak és ne módosuljon. Amennyiben úgy véljük, hogy a mechanikai folyamatok (például a túlzott őrlésből adódó súrlódás miatt kialakult szélsőséges hőmérséklet) megváltoztatták a vizsgált vegyi anyag összetételét, a vizsgált vegyi anyag összetételét analitikai úton ellenőrizni kell. Kellő figyelmet kell fordítani a vizsgált vegyi anyag szennyeződésének elkerülésére. A nem morzsálódó, szándékosan belélegezhetetlen összetétellel készült szemcsés anyagokat nem szükséges vizsgálni. Kopásvizsgálattal kell igazolni, hogy a szemcsés anyag kezelése során nem keletkeznek belélegezhető részecskék. Ha a kopásvizsgálat során belélegezhető részecskék keletkezését észlelik, inhalációs toxicitási vizsgálatot kell végezni.

Kontrollállatok

16. Negatív (levegővel kezelt) kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata nem szükséges. Amennyiben a vizsgálati légkör létrehozása során víztől eltérő vivőanyagot alkalmazunk, vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportra csak akkor van szükség, ha nem állnak rendelkezésre múltbeli inhalációs toxicitási adatok. Ha a vivőanyaggal kevert vizsgált vegyi anyag a toxicitási vizsgálat alapján nem bizonyul toxikusnak, a vizsgált koncentráció mellett a vivőanyag sem tekintendő toxikusnak, tehát nincs szükség vivőanyaggal kezelt kontrollra.

AZ EXPOZÍCIÓS KÖRÜLMÉNYEK NYOMON KÖVETÉSE

Kamrabeli légáramlás

17. A kamrán keresztüli légáramlást gondosan szabályozni kell, folyamatosan nyomon kell követni, és minden expozíció során legalább óránként fel kell jegyezni. A vizsgálati légköri koncentráció (vagy stabilitás) nyomon követése valamennyi dinamikus paraméter globális mérését jelenti, és közvetett lehetőséget nyújt a légkör előállítása szempontjából lényeges összes dinamikus paraméter szabályozására. Különös figyelmet kell fordítani a csak orron át történő expozícióra szolgáló kamrában az újbóli belélegzés elkerülésére, amennyiben az expozíciós rendszeren keresztüli légáramlás nem elegendő a vizsgált vegyi anyagot tartalmazó légkör dinamikus áramlásának biztosítására. Előírt módszerek állnak rendelkezésre annak igazolására, hogy a választott működési körülmények között nem történik újbóli belélegzés (8) (15). Az oxigénkoncentrációnak legalább 19 %-nak kell lennie, a szén-dioxid-koncentráció pedig legfeljebb 1 % lehet. Amennyiben bármilyen okból feltételezhető, hogy ezek a szabványok nem teljesíthetők, az oxigén- és szén-dioxid-koncentrációt mérni kell.

A kamra hőmérséklete és relatív páratartalma

18. A kamra hőmérsékletét 22 ± 3 °C-on kell tartani. Az állatok belégzési zónájában fennálló relatív páratartalmat a csak orron át történő és az egész testfelületen keresztüli expozíció esetén egyaránt nyomon kell követni, és legfeljebb 4 órás időtartamú expozíciók esetén legalább háromszor, rövidebb időtartamok esetén pedig óránként fel kell jegyezni. A relatív páratartalmat ideális esetben 30–70 %-os tartományban kell tartani, ugyanakkor előfordulhat, hogy ez vagy nem érhető el (például vízalapú keverékek vizsgálata esetén), vagy nem mérhető a vizsgált vegyi anyag vizsgálati módszerrel való interferenciája miatt.

▼M4

Vizsgált vegyi anyag: névleges koncentráció

19. Az expozíciós kamrában fennálló névleges koncentrációt lehetőség szerint ki kell számítani és fel kell jegyezni. A névleges koncentrációt úgy kapjuk meg, hogy az előállított vizsgált vegyi anyag tömegét elosztjuk a kamrarendszeren áthaladt levegő össztérfogatával. A névleges koncentráció nem az állatok expozíciójának jellemzésére szolgál, ugyanakkor a névleges és a tényleges koncentráció összehasonlításával megismerhető a vizsgálati rendszer előállítási hatásfoka, és így feltárhatók az előállítással összefüggő problémák.

Vizsgált vegyi anyag: tényleges koncentráció

20. A tényleges koncentráció a vizsgált vegyi anyagnak az inhalációs kamrán belül, az állatok belégzési zónájában fennálló koncentrációját jelenti. A tényleges koncentráció vagy specifikus módszerekkel (például közvetlen mintavétellel, adszorpciós vagy kémiai reakcióképességet vizsgáló módszerekkel, valamint utólagos analitikai jellemzéssel), vagy nem specifikus módszerekkel, például gravimetriai szűrőelemzéssel határozható meg. A gravimetriai elemzés csak egykomponensű, por alakú aeroszolok, illetve alacsony illékonyságú folyadékok aeroszoljai esetén elfogadható, és alkalmazását a vizsgált vegyi anyag megfelelő, a vizsgálat előtt végzett jellemzésével kell alátámasztani. A gravimetriai elemzés a többkomponensű, por alakú aeroszolok koncentrációjának meghatározására szintén alkalmazható. Ebben az esetben azonban analitikai adatokkal kell alátámasztani, hogy a levegőben lévő anyag összetétele hasonló a kiindulási anyagéhoz. Amennyiben ilyen információ nem áll rendelkezésre, a (lehetőleg levegőben lebegő) vizsgált vegyi anyag rendszeres időközönként végzett újbóli elemzésére lehet szükség a vizsgálat során. Olyan aeroszolizálódott ágensek esetén, amelyek elpárologhatnak vagy szublimálhatnak, igazolni kell, hogy mindegyik fázisból a választott módszerrel vettünk mintát. A cél-, névleges és tényleges koncentrációt fel kell tüntetni a vizsgálati jegyzőkönyvben, azonban a letális koncentráció értékének kiszámításához csak a tényleges koncentrációkat kell felhasználni.

21. Lehetőség szerint a vizsgált vegyi anyag egyetlen tételét kell használni, és a vizsgált mintát olyan körülmények között kell tárolni, hogy megőrződjön annak tisztasága, homogenitása és stabilitása. A vizsgálat megkezdését megelőzően el kell végezni a vizsgált vegyi anyag jellemzését, meghatározva többek között annak tisztaságát, valamint amennyiben technikailag lehetséges, az észlelt szennyező anyagok és szennyeződések azonosságát és mennyiségét. Ez többek között – de nem kizárólag – a következő adatokkal mutatható ki: retenciós idő és relatív csúcsterület, tömegspektroszkópiai vagy gázkromatográfiás elemzéssel, illetve más becslésekkel meghatározott molekulatömeg. Bár a vizsgált minta azonosságának meghatározása nem tartozik a vizsgálati laboratórium feladatai közé, óvatosságból érdemes lehet a vizsgálati laboratóriumban legalábbis korlátozott módon (például szín, fizikai jelleg stb. alapján) megerősíteni a megbízó által adott jellemzést.

22. Az expozíciós légkört amennyire csak lehet, állandó állapotban kell tartani, továbbá az analitikai módszertől függően folyamatosan és/vagy időszakosan nyomon kell követni. Időszakos mintavétel esetén a kamrából a négyórás vizsgálat során legalább kétszer kell légköri mintát venni. Ha az alacsony légáramlási sebesség vagy koncentráció miatt ez nem megoldható, a teljes expozíciós időszak alatt egy mintavétel végezhető. Ha jelentős ingadozás figyelhető meg az egyes minták között, a következőnek vizsgált koncentrációkat expozíciónként négy minta alapján kell vizsgálni. Az egyes kamrakoncentráció-minták gázok és gőzök esetén legfeljebb ± 10 %-kal, folyékony vagy szilárd aeroszolok esetén pedig legfeljebb ± 20 %-kal térhetnek el a kamrabeli átlagkoncentrációtól. A kamra egyensúlyi állapotának kialakulásához szükséges időt (t_{95}) ki kell számítani és fel kell jegyezni. Egy adott expozíció időtartama magában foglalja a vizsgált vegyi anyag előállításának idejét, utóbbihoz pedig figyelembe kell venni a t_{95} eléréséhez szükséges időt. A t_{95} becsléséhez a 39. iránymutatásban (8) található útmutatás.

▼M4

23. A nagyon összetett, gőzökből/gázokból és aeroszolokból álló keverékek (például égési légkörök, valamint meghatározott célra szolgáló végfelhasználói termékekből/készülékekből kibocsátott vizsgált vegyi anyagok) esetén az egyes fázisok eltérően viselkedhetnek az inhalációs kamrában, ezért mindegyik fázishoz (gőz/gáz és aeroszol) legalább egy indikátoranyagot (analitot) – általában a keverék elsődleges hatóanyagát – kell kiválasztani. Amennyiben a vizsgált vegyi anyag keverék, az analitikai koncentrációt a teljes keverék, nem pedig csak az aktív összetevő vagy a komponens (analit) vonatkozásában kell a jegyzőkönyvben feltüntetni. A tényleges koncentrációról további információ a 39. iránymutatásban található (8).

Vizsgált vegyi anyag: részecskeméret-eloszlás

24. Az aeroszolok részecskeméret-eloszlását mindegyik 4 órás expozíció során legalább kétszer meg kell határozni sorozatos ütközésmérő vagy alternatív műszer, például aerodinamikai részecskeméret-meghatározó segítségével. Ha bizonyítható, hogy a sorozatos ütközésmérővel és az alternatív műszerrel kapott eredmények egyeznek, az alternatív műszer a teljes vizsgálat folyamán használható. Az elsődleges műszerrel párhuzamosan egy második eszközt, például gravimetriai szűrőt vagy impingert/gázbuborékoltatót kell használni az elsődleges műszer mintavételi hatékonyságának megerősítése érdekében. A részecskeméret-elemzés útján kapott tömegkoncentrációnak a szűrőelemzéssel kapott tömegkoncentrációt ésszerű mértékben meg kell közelítenie (lásd a 39. iránymutatást (8)). Ha a vizsgálat kezdeti szakaszában egyezés mutatható ki, a további megerősítő mérések mellőzhetők. Az állatok jóléte érdekében intézkedéseket kell tenni az expozíció eseteges megismétlését szükségessé tevő kétes adatok előfordulásának minimalizálása érdekében. Gőzök esetén részecskeméretezést kell végezni, ha fennáll annak a lehetősége, hogy a gőz lecsapódásával aeroszol keletkezhet, vagy ha vegyes fázisok alkotására képes részecskéket észlelünk a gőzatmoszférában (lásd a 14. bekezdést).

ELJÁRÁS

Fő vizsgálat

25. Minden szakaszhoz nemenként három állatot, vagy az anyagra érzékenyebb nemből hat állatot kell használni. Patkányoktól eltérő rágcsálófajok csak orron át történő expozíciója esetén az expozíció maximális időtartama kiigazítható a fajspecifikus szorongás minimalizálása érdekében. A kiindulási dózisként alkalmazandó koncentrációszintet négy meghatározott szint közül kell kiválasztani, és kiindulási koncentrációszintként azt a szintet kell választani, amely a legnagyobb valószínűséggel eredményez toxicitást a kezelt állatok némelyikénél. A gázokra, gőzökre és aeroszolokra vonatkozó (a 2–4. függelékben bemutatott) vizsgálati rendszerek az 1–4. CLP-kategória (9) határértékeivel történő vizsgálatokra vonatkoznak gázok (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 h) (2. függelék), gőzök (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 h) (3. függelék) és aeroszolok (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4 h) (4. függelék) esetében. Az 1272/2008/EK rendeletben (9) nem szereplő 5. kategória a vonatkozó határkoncentrációkat meghaladó koncentrációkra vonatkozik. Minden egyes kiindulási koncentrációra a vonatkozó vizsgálati rendszert kell alkalmazni. A humánus módon elpusztított vagy elhullott állatok számától függően a vizsgálati eljárás a jelzett nyilakat követi mindaddig, amíg az osztályozás el nem végezhető.

26. Az egyes expozíciós csoportok vizsgálata közötti időtartamot a mérgezési tünetek megjelenésének időpontja, időtartama és súlyossága határozza meg. Az állatok következő koncentrációszintnek való expozícióját addig kell halasztani, amíg ésszerű biztonsággal nem várható az előzőleg vizsgált állatok túlélése. Minden egyes koncentrációszint esetében az expozíciók között három- vagy négynapos időszak biztosítása javasolt a késleltetett toxicitás megfigyelésének lehetővé tétele érdekében. Ez az időtartam szükség szerint – például nem egyértelmű válaszok esetén – kiigazítható.

▼M4

Határérték-vizsgálat

27. Határérték-vizsgálatot akkor kell végezni, ha a vizsgált vegyi anyagról ismert vagy várható, hogy gyakorlatilag nem mérgező, azaz csak a hatóságilag előírt határkoncentráció felett idéz elő toxikus reakciót. A vizsgált vegyi anyag toxicitásával kapcsolatban hasonló vizsgált anyagokra vagy hasonló keverékekre vonatkozó adatokból nyerhetők információk, figyelembe véve a toxikológiai szempontból fontos komponenseket, valamint azok százalékos arányát. Olyan esetekben, ha kevés az anyag toxicitásával kapcsolatos információ, vagy egyáltalán nem áll rendelkezésre, vagy ha a vizsgálandó vegyi anyag várhatóan toxikus, a fő vizsgálatot kell elvégezni (további útmutatás a 39. iránymutatásban (8) található).

28. A jelen vizsgálati módszer határérték-vizsgálataként szolgáló szokásos eljárás alkalmazása során nemenként három állatot, vagy az anyagra érzékenyebb nemből hat állatot teszünk ki gázok esetén 20 000 ppm, gőzök esetén 20 mg/l, porok/párák esetén pedig 5 mg/l koncentrációnak (ha ez megvalósítható). Aeroszolok vizsgálata esetén az elsődleges cél a belélegezhető részecskeméret (azaz 1–4 μm-es MMAD) elérése. Ez a legtöbb vizsgált vegyi anyag esetén 2 mg/l koncentrációnál érhető el. Aeroszolok 2 mg/l feletti koncentráció mellett történő vizsgálatát csak akkor szabad megkísérelni, ha ezzel elérhető a belélegezhető részecskeméret (lásd a 39. iránymutatást (8)). A GHS-nek (16) megfelelően a határkoncentrációt meghaladó koncentrációnál végzett vizsgálat állatjóléti okokból nem javasolt. Az 1272/2008/EK rendeletben (9) nem szereplő 5. GHS-kategóriában (16) végzett vizsgálatot csak abban az esetben szabad kilátásba helyezni, ha egy ilyen vizsgálat eredménye nagy valószínűséggel közvetlen jelentőséggel bírna az emberi egészség védelme szempontjából, továbbá ha mindezt a vizsgálati jegyzőkönyvben indokoljuk. Robbanásveszélyes vizsgált vegyi anyagok esetén ügyelni kell a robbanást elősegítő körülmények elkerülésére. A szükségtelen állatkísérletek elkerülése végett a határérték-vizsgálatot megelőzően állatok nélküli próbavizsgálatot kell végezni annak érdekében, hogy a kamrában elérhetők legyenek a határérték-vizsgálathoz szükséges körülményeket.

MEGFIGYELÉSEK

29. Az expozíció időtartama alatt az állatokat gyakori klinikai megfigyeléseknek kell alávetni. Az expozíciót követően az expozíció napján legalább kétszer, vagy – amennyiben az állatok kezelésre adott reakciója ezt indokolja – annál gyakrabban, az azt követő 14 nap során pedig naponta legalább egyszer klinikai megfigyeléseket kell végezni. A megfigyelés időtartama nem rögzített, hanem a klinikai tünetek jellege és jelentkezésének ideje, valamint a felépülés időtartama alapján határozandó meg. Fontos a toxicitási tünetek megjelenésének és megszűnésének időpontja, különösen, ha fennáll a toxicitási tünetek késleltetett megjelenésének tendenciája. Minden megfigyelést szisztematikusan rögzíteni kell olyan módon, hogy minden állat esetében önálló adatsort veszünk fel. Állatjóléti okokból humánus módon el kell pusztítani az elhullásközeli állapotban lévő, valamint súlyos fájdalom és/vagy tartós és súlyos szorongás jeleit mutató állatokat. A toxicitás klinikai tünetei előfordulásának vizsgálata során ügyelni kell arra, hogy az expozíciós eljárás okozta kezdeti beteges megjelenést és átmeneti légúti változásokat ne azonosítsuk tévesen a kezeléssel összefüggő hatásokként. A humánus végpontokra vonatkozó iránymutatásban összegzett elveket és feltételeket figyelembe kell venni (7). Ha az állatokat humánus okok miatt el kell pusztítani, vagy ha azok elhullnak, a lehető legpontosabban fel kell jegyezni az elhullás időpontját.

▼M4

30. A ketrecben tartott állatok megfigyelésének ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártya, valamint a légzőrendszer, a keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszer, továbbá a szomatomotoros aktivitás és a viselkedési minták változásaira. Lehetőség szerint fel kell jegyezni, ha különbséget lehet tenni a helyi és szisztémás hatások között. Figyelmet kell szentelni a remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma megfigyelésére. A végbélben mért hőmérséklet bizonyítékot szolgáltathat a kezelés vagy a fogság okozta bradipnoés reflexre vagy hipo-/hipertermiára.

Testsúly

31. Az egyes állatok súlyát az szoktatási időszak során egy alkalommal, az expozíció napján (0. nap) az expozíció előtt, valamint legalább az 1., 3. és 7. napon (azt követően pedig hetente) egy-egy alkalommal, továbbá az 1. napon túli elhullás vagy elpusztítás időpontjában fel kell jegyezni. A testsúly a toxicitás kulcsfontosságú indikátorának számít, és a vizsgálat előtti értékekhez képest legalább 20 %-os tartós súlycsökkenést mutató állatokat szorosan figyelemmel kell kísérni. Az expozíciót követő időszak végén az életben maradt állatokat újra megmérjük, majd humánus módon elpusztítjuk.

Patológia

32. Minden kísérleti állatot makroszkópos boncolásnak kell alávetni, azokat is, amelyek a vizsgálat során elpusztultak, vagy amelyeket állatjóléti okok miatt el kellett pusztítani és ki kellett vonni a vizsgálatból. Ha a boncolás nem végezhető el rögtön azután, hogy az elpusztult állatot észrevették, az állatot hűtve (nem fagyasztva) kell tárolni az autolízis minimalizálásához kellően alacsony hőmérsékleten. A boncolást a lehető leghamarabb, általában egy vagy két napon belül el kell végezni. Minden állat esetén fel kell jegyezni minden makroszkopikus patológiai elváltozást, különös tekintettel a légzőrendszert érintő változásokra.

33. A vizsgálat értelmező értékének fokozása érdekében előzetesen, terv szerint kilátásba helyezhetők olyan további vizsgálatok, mint az életben maradt patkányok tüdeje súlyának megmérése és/vagy az irritációnak a légzőrendszer mikroszkópos vizsgálatával való igazolása. Megvizsgálhatók azok a szervek is, amelyek makroszkopikus patológia jeleit mutatják 24 óráig vagy annál tovább életben maradt állatoknál, valamint olyan szervek, amelyekről ismert vagy várható, hogy a vizsgált anyag hatást gyakorolt azokra. A teljes légzőrendszer mikroszkópos vizsgálata hasznos információkkal szolgálhat a vízzel könnyen reagáló vizsgált vegyi anyagokról, például a savakról és higroszkópos vegyi anyagokról.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

34. Meg kell adni az egyes állatok testsúlyával és boncolási eredményeivel kapcsolatos adatokat. A klinikai megfigyelések adatait táblázatos formában össze kell foglalni, minden egyes vizsgált csoporthoz megadva a csoportban lévő állatok számát, a specifikus mérgezési tüneteket mutató, valamint a vizsgálat során elhullott vagy humánus okokból elpusztított állatok számát, az egyes állatok elhullásának időpontját, a toxikus hatások leírását, időbeli lefolyását és visszafordíthatóságát, valamint a boncolások eredményeit.

▼M4

Vizsgálati jegyzőkönyv

35. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell értelemszerűen tartalmaznia:

Kísérleti állatok és azok tartása

— a ketrecben való tartás körülményei, beleértve a következőket: az állatok ketrecenkénti száma (vagy számának változása), az alom anyaga, környezeti hőmérséklet és relatív páratartalom, a megvilágítás időtartama, valamint a takarmány meghatározása,

— a vizsgált faj/törzs, valamint a patkánytól eltérő faj alkalmazásának indokolása,

— az állatok száma, kora és neme,

— a véletlen kiválasztás módszere,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány típusa/eredete, a víz eredete),

— a vizsgálat előtti esetleges kondicionálás leírása, beleértve a takarmányt, a karantént és a betegség kezelését,

Vizsgált vegyi anyag

— fizikai jelleg, tisztaság, valamint – ha lényeges – fizikai és kémiai tulajdonságok (beleértve az izomerizációt),

— azonosító adatok és – amennyiben ismert – a Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám),

Vivőanyag

— a vivőanyag használatának, valamint kiválasztásának indokolása (ha a vivőanyag nem víz),

— múltbeli vagy párhuzamosan kapott adatok, amelyek igazolják, hogy a vivőanyag nem befolyásolja a vizsgálat eredményét,

Inhalációs kamra

— az inhalációs kamra leírása, beleértve annak méreteit és térfogatát,

— az állatok expozíciójához és a légkör előállításához használt berendezések eredete és leírása,

— a hőmérséklet, páratartalom, részecskeméret és tényleges koncentráció mérésére szolgáló berendezések,

— a levegő forrása, a bevitt/elszívott levegő kezelése, valamint a kondicionáló rendszer,

— az eszközök homogén vizsgálati légkör biztosítása érdekében történő kalibrálására alkalmazott módszerek,

— nyomáskülönbség (pozitív vagy negatív),

— expozíciós nyílások száma kamránként (csak orron keresztüli expozíció), az állatok helye a rendszerben (egész testfelületen keresztüli expozíció),

— a vizsgálati légkör időbeli homogenitása/stabilitása,

— a hőmérséklet- és páratartalom-érzékelők, valamint a vizsgálati légkör mintavételének helye a kamrában,

— légáramlási sebességek, légáramlási sebesség expozíciós nyílásonként (csak orron keresztüli expozíció), vagy az állatok terhelése kamránként (egész testfelületen keresztüli expozíció),

— adott esetben az oxigén és a szén-dioxid mérésére használt eszközökre vonatkozó információk,

▼M4

— az inhalációs kamra egyensúlyi állapotának eléréséhez szükséges idő (t_{95}),

— a térfogatváltozások óránkénti száma,

— mérőberendezések (ha vannak),

Expozíciós adatok

— a fő vizsgálathoz kiválasztott célkoncentráció indokolása,

— névleges koncentrációk (az inhalációs kamrába való bejuttatásra előállított vizsgált vegyi anyag össztömege osztva a kamrán áthaladt levegő térfogatával),

— a vizsgált vegyi anyagnak az állatok belégzési zónájából gyűjtött tényleges koncentrációi; a heterogén halmazállapotokat (gáz, gőz, aeroszol) felvevő vizsgált keverékek esetén mindegyik külön elemezhető,

— minden levegőbeli koncentrációt tömegegységekben (például mg/l, mg/m^3 stb.) kell megadni; zárójelben a térfogategységekben (például ppm, ppb) kifejezett értékek is feltüntethetők,

— részecskeméret-eloszlás, tömegfelező aerodinamikai átmérő (MMAD), valamint geometriai szórás (σ_g), beleértve azok kiszámításának módját. Jegyzőkönyvezni kell az egyes részecskeméret-elemzéseket,

Vizsgálati körülmények

— A vizsgált vegyi anyag előkészítésének részletei, beleértve a szilárd anyagok részecskeméretének csökkentésére vagy a vizsgált vegyi anyag oldatainak elkészítésére esetlegesen alkalmazott eljárások részleteit. mennyiben a mechanikai folyamatok megváltoztatták a vizsgált vegyi anyag összetételét, a vizsgált vegyi anyag összetételének ellenőrzése érdekében végzett elemzések eredményeit is fel kell tüntetni,

— a vizsgálati légkör előállítására és az állatok vizsgálati légkörnek való kitételére alkalmazott berendezések leírása (lehetőség szerint vázlatrajzzal),

— az alkalmazott kémiai analitikai módszer és a módszer validációjának részletei (beleértve a vizsgált vegyi anyag mintavételi közegből való visszanyerésének hatásfokát),

— a vizsgált koncentrációk kiválasztásának indokolása,

Eredmények

— a kamrabeli hőmérséklet, páratartalom és légáramlás táblázatos összefoglalása,

— a kamra névleges és tényleges koncentrációs adatainak táblázatos összefoglalása,

— részecskeméret-adatok táblázatos összefoglalása, beleértve az analitikai mintavételi adatokat, a részecskeméret-eloszlást, valamint az MMAD és a σ_g számításait,

— a válaszadatok és a koncentrációszintek táblázatos összefoglalása minden egyes állatra vonatkozóan (azaz a mérgezési tüneteket mutató és elhullt állatok, a hatások jellege, súlyossága és időtartama),

— az egyes állatok vizsgálati napokon mért testsúlya, az elhullás dátuma és időpontja, amennyiben az a tervszerű elpusztítást megelőzően történt, a toxicitási tünetek megjelenésének időbeli alakulása, valamint annak megjelölése, hogy azok visszafordíthatók voltak-e az egyes állatoknál,

▼M4

— a boncolások és adott esetben a kórszövettani vizsgálatok eredményei minden egyes állatra vonatkozóan,

— CLP-kategóriák szerinti besorolás és az LC_{50}-határérték,

Az eredmények szöveges értékelése és értelmezése

— különös hangsúlyt kell fektetni az e vizsgálati módszer feltételeinek – például a határkoncentrációnak vagy a részecskeméretnek – való megfelelés érdekében alkalmazott módszerek leírására,

— ki kell térni a részecskék belélegezhetőségére az általános megállapítások tükrében, különösen ha a részecskeméretre vonatkozó feltétel nem teljesült,

— a vizsgálat általános értékelésének ismertetnie kell a névleges és a tényleges koncentrációk meghatározására használt módszerek konzisztenciáját, valamint a tényleges és a névleges koncentráció közötti összefüggést,

— ki kell térni az elhullás valószínű okára, valamint az elsődleges hatásmechanizmusra (szisztémás vagy helyi),

— magyarázatot kell szolgáltatni, amennyiben a humánus végpontokról szóló OECD-iránymutatás (7) szerinti kritériumok alapján humánus módon el kellett pusztítani a fájdalommal küszködő vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutató állatokat.

SZAKIRODALOM

(1) E melléklet B.2., Akut toxicitás (inhaláció) című fejezete.

(2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.

(3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

(4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129-134.

(5) E melléklet B.1b., Akut orális toxicitás – Akut toxikus osztály módszer című fejezete.

(6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(9) Az Európai Parlament és a Tanács 2008. december 16-i 1272/2008/EK rendelete az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról, HL L 353., 2008.12.31., 1. o.

▼**M4**

(10) E melléklet B.40., In vitro bőrkorrózió: transzkután elektromos rezisztencia vizsgálat (TER) című fejezete.

(11) E melléklet B.40a., In vitro bőrkorrózió: emberi bőrmodellen végzett vizsgálat című fejezete.

(12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

(14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appéldául Toxicol.* 18: 321-327.

(15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appéldául Toxicol. 27: 160-167

(16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Available: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

▼**M4**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁS

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼M4

2. függelék

Az egyes kiindulási gázkoncentrációk esetében követendő eljárás (ppm/4 óra)

Általános megjegyzések ([1])

Az egyes kiindulási koncentrációk esetében a jelen függelékben leírt vonatkozó vizsgálati rendszer vázolja a követendő eljárást.

2.a. függelék: a kiindulási koncentráció 100 ppm

2.b. függelék: a kiindulási koncentráció 500 ppm

2.c. függelék: a kiindulási koncentráció 2 500 ppm

2.d. függelék: a kiindulási koncentráció 20 000 ppm

A humánus módon elpusztított vagy elhullott állatok számától függően a vizsgálati eljárás a megjelölt nyilakat követi.

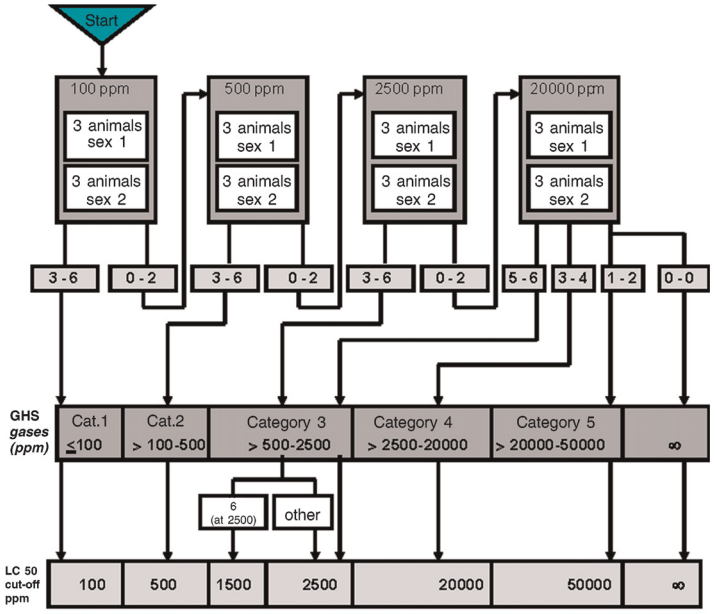
([1]) Az alábbi táblázatokban a GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals) rendszerre találhatók hivatkozások. A rendszer uniós megfelelője az 1272/2008/EK rendelet. Az akut inhalációs toxicitás esetében az 1272/2008/EK rendeletben (9) nem szerepel az 5. kategória.

▼M4

2.a. függelék

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

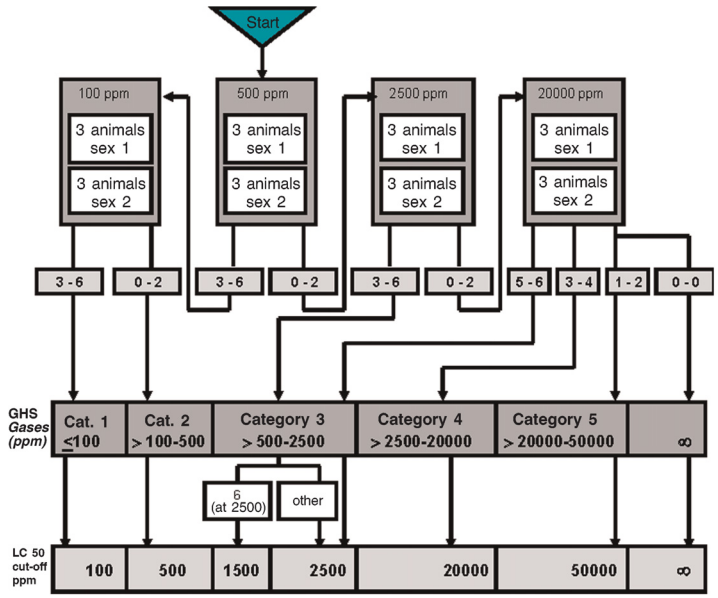
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

2.b. függelék

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

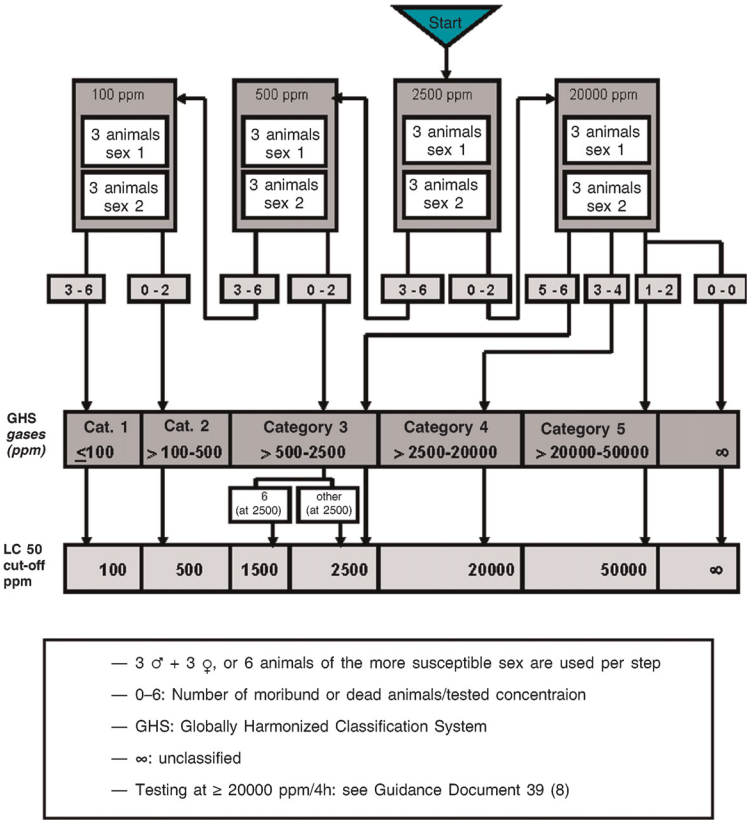
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

2.c. függelék

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

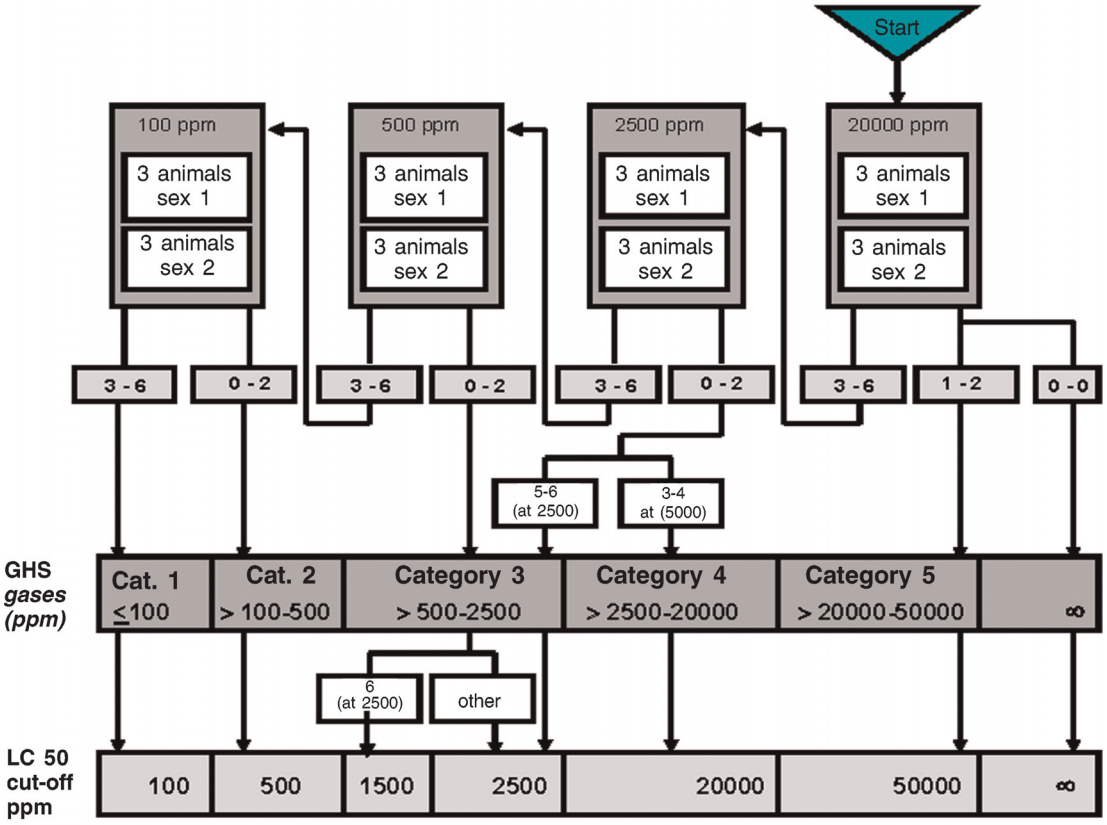
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

2.d. függelék

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

3. függelék

Az egyes kiindulási gőzkoncentrációk esetében követendő eljárás (mg/l/4 óra)

Általános megjegyzések ([1])

Az egyes kiindulási koncentrációk esetében a jelen függelékben leírt vonatkozó vizsgálati rendszer vázolja a követendő eljárást.

3.a. függelék: a kiindulási koncentráció 0,5 mg/l

3.b. függelék: a kiindulási koncentráció 2,0 mg/l

3.c. függelék: a kiindulási koncentráció 10 mg/l

3.d. függelék: a kiindulási koncentráció 20 mg/l

A humánus módon elpusztított vagy elhullott állatok számától függően a vizsgálati eljárás a megjelölt nyilakat követi.

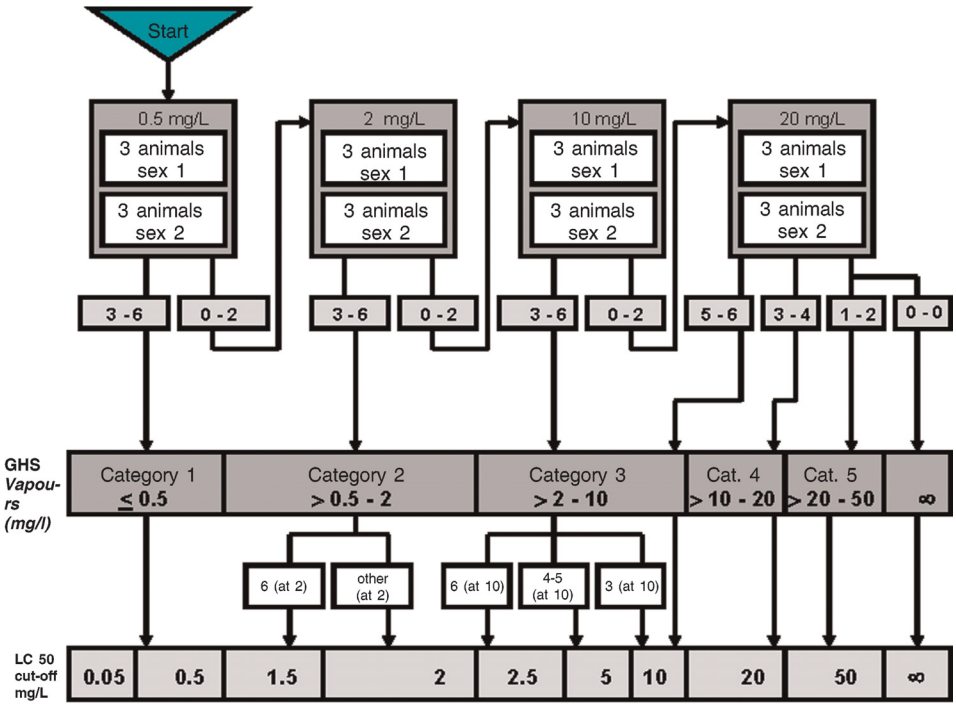
([1]) Az alábbi táblázatokban a GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals) rendszerre találhatók hivatkozások. A rendszer uniós megfelelője az 1272/2008/EK rendelet. Az akut inhalációs toxicitás esetében az 1272/2008/EK rendeletben (9) nem szerepel az 5. kategória.

▼M4

3.a. függelék

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

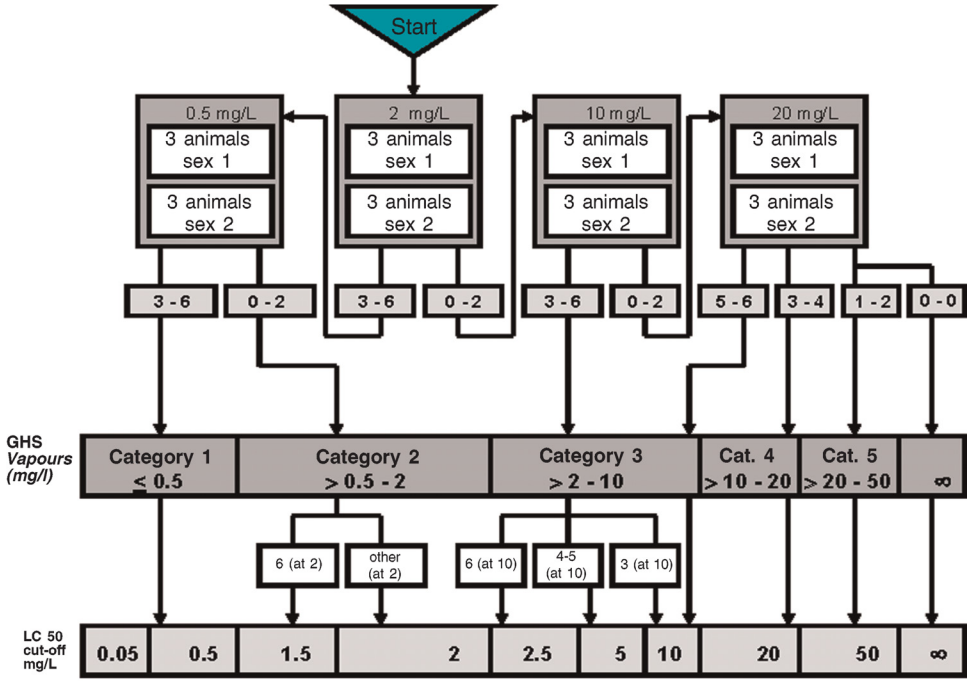
— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

3.b. függelék

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

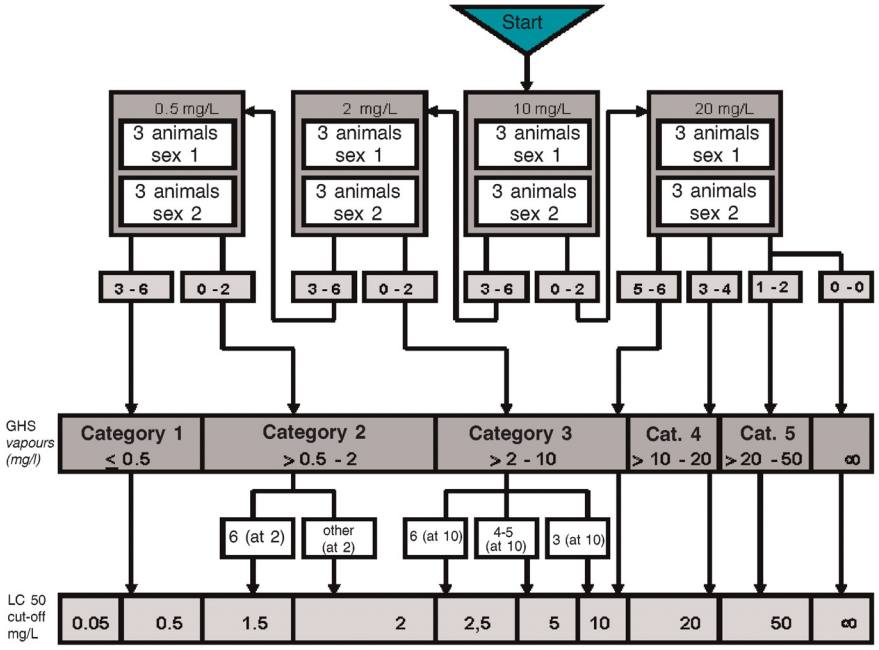
— Testing at 50 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

3.c. függelék

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

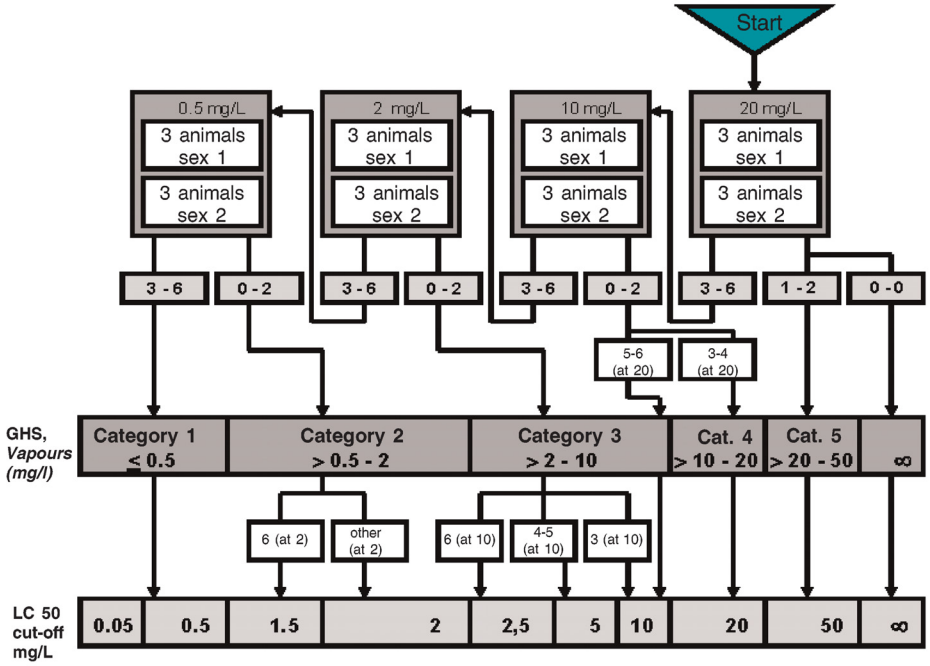
— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

3.d. függelék

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

4. függelék

Az egyes kiindulási aeroszolkoncentrációk esetében követendő eljárás (mg/l/4 óra)

Általános megjegyzések ([1])

Az egyes kiindulási koncentrációk esetében a jelen függelékben leírt vonatkozó vizsgálati rendszer vázolja a követendő eljárást.

4.a. függelék: a kiindulási koncentráció 0,05 mg/l

4.b. függelék: a kiindulási koncentráció 0,5 mg/l

4.c. függelék: a kiindulási koncentráció 1 mg/l

4.d. függelék: a kiindulási koncentráció 5 mg/l

A humánus módon elpusztított vagy elhullott állatok számától függően a vizsgálati eljárás a megjelölt nyilakat követi.

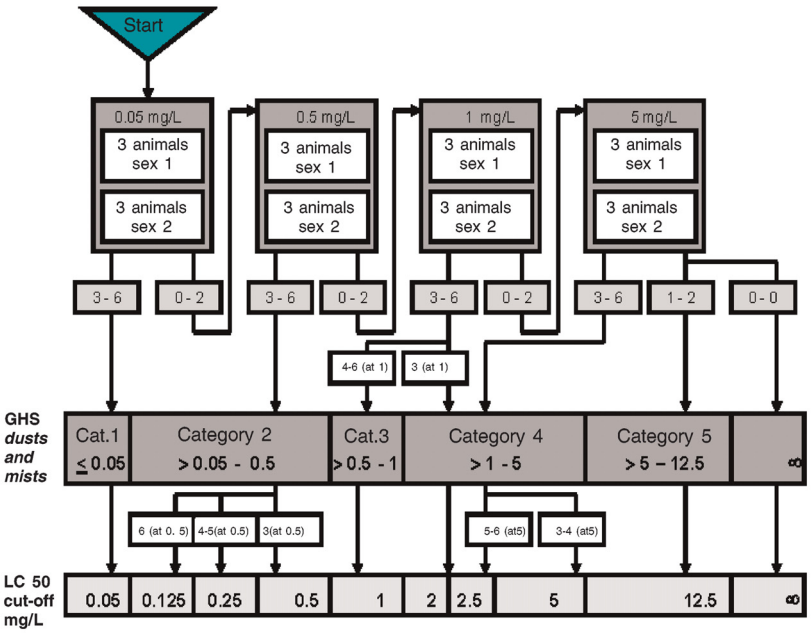
([1]) Az alábbi táblázatokban a GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals) rendszerre találhatók hivatkozások. A rendszer uniós megfelelője az 1272/2008/EK rendelet. Az akut inhalációs toxicitás esetében az 1272/2008/EK rendeletben (9) nem szerepel az 5. kategória.

▼M4

4.a. függelék

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0.05 mg/L/4h for vapours



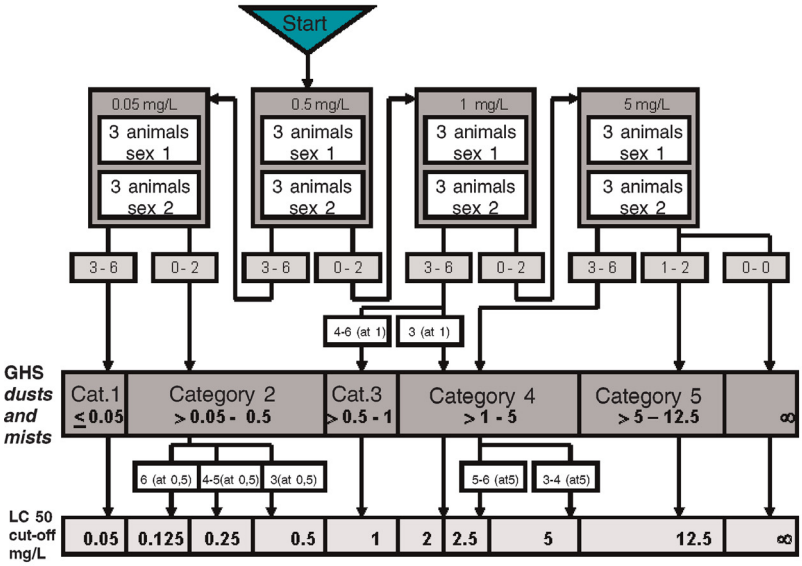
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

4.b. függelék

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0.5 mg/L/4h for aerosols



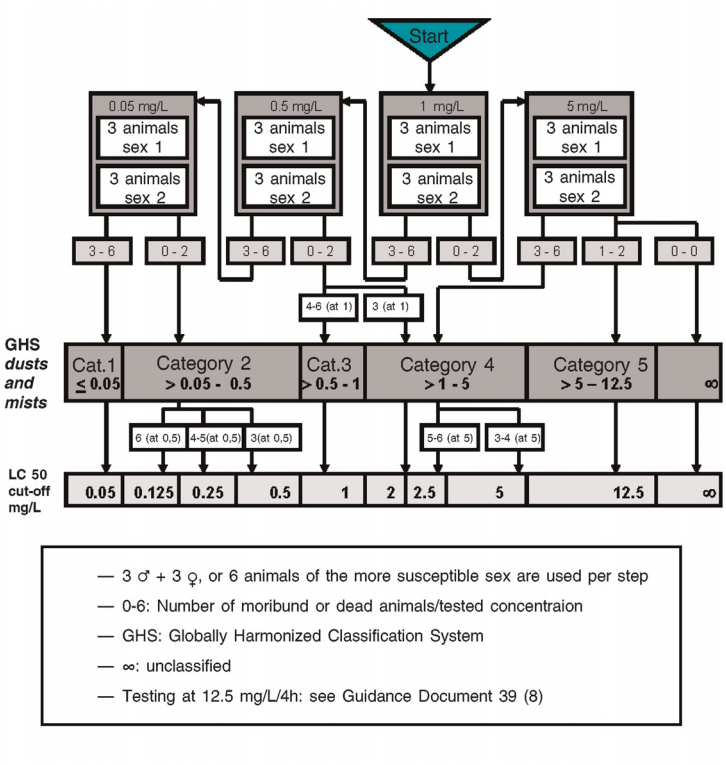
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

4.c. függelék

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 1 mg/L/4h for aerosols



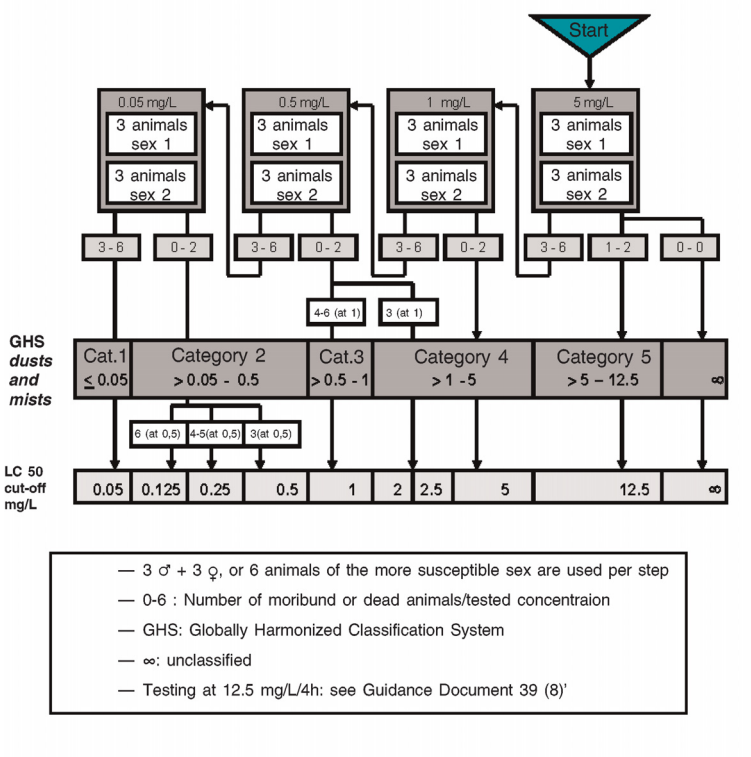
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

4.d. függelék

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. FEJLŐDÉSI NEUROTOXICITÁSI VIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 426. vizsgálati iránymutatásában (2007) leírt módszerrel. Az OECD szaporodási és fejlődési toxicitási munkacsoportja 1995 júniusában, Koppenhágában megvitatta, hogy frissíteni kell a reprodukciós és fejlődési toxicitásra vonatkozó, meglévő OECD vizsgálati iránymutatásokat, és új iránymutatásokat kell kidolgozni a még le nem fedett végpontokra (1). A munkacsoport azt javasolta, hogy a fejlődési neurotoxicitásra vonatkozó vizsgálati iránymutatást az amerikai EPA útmutató alapján kell összeállítani, amelyet azóta módosítottak (2). 1996 júniusában egy második konzultációs találkozót tartottak Koppenhágában, hogy útmutatót adjanak a Titkárság számára a fejlődési neurotoxicitásra vonatkozó új vizsgálati iránymutatás vázlatának összeállításához, beleértve a főbb elemekre, például az állatfaj kiválasztására, az adagolási időszakra, a tesztelési időszakra, a megvizsgálandó végpontokra, és az eredmények értékelésének kritériumaira vonatkozó részleteket. Az amerikai neurotoxicitási kockázatértékelési irányelv 1998-ban jelent meg (3). 2000 októberében egymás után egy OECD szakértői konzultációs értekezletet és egy ILSI Risk Science Institute workshopot, valamint 2005-ben Tokióban egy szakértői konzultációs találkozót tartottak. Ezeket a találkozókat abból a célból tartották, hogy megvitassák a jelenlegi vizsgálati iránymutatással kapcsolatos tudományos és technikai kérdéseket, és az üléseken (4) (5) (6) (7) hozott javaslatokat figyelembe vették a vizsgálati módszer kifejlesztése során. A vizsgálati módszer végrehajtására, értelmezésére és a használt terminológiára vonatkozó további információk megtalálhatók a reproduktív toxicitási vizsgálatokról és értékelésükről szóló 43. számú (8) és a neurotoxicitási vizsgálatokról szóló 20. számú (9) OECD irányelvben.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

2. Számos vegyi anyagról ismert, hogy fejlődési neurotoxikus hatást fejt ki emberben és más fajokban (10) (11) (12) (13). A vegyi anyag toxikus tulajdonságainak felmérése és értékelése céljából a potenciális fejlődési neurotoxicitás meghatározására lehet szükség. A fejlődési neurotoxicitási vizsgálatok célja, hogy adatokat – beleértve a dózis-válasz jellemzést – szolgáltassanak az utódok fejlődő idegrendszerére gyakorolt potenciális funkcionális és morfológiai hatásokról, amelyek a méhen belüli és a korai életszakaszban történt expozíció következtében esetlegesen felmerülhetnek.

3. A fejlődési neurotoxicitási vizsgálatot el lehet elvégezni külön vizsgálatként, be lehet építeni a reprodukciós toxicitási és/vagy felnőtt neurotoxicitási vizsgálatba (pl. B.34. (14), B.35. (15), B.43. (16) vizsgálati módszerek), vagy ki lehet vele egészíteni a prenatális fejlődési toxicitási vizsgálatot (pl. B.31 (17) vizsgálati módszer). Amikor a fejlődési neurotoxicitási vizsgálat be van építve vagy hozzá van kapcsolva egy másik vizsgálathoz, elengedhetetlen mindkét vizsgálati típus integritásának megőrzése. A vizsgálatok során meg kell felelni a laboratóriumi állatok kutatásokban történő használatára vonatkozó jogszabályoknak, illetve kormányzati és intézményi iránymutatásoknak (pl. 18).

4. A vizsgáló laboratóriumnak a vizsgálat elvégzése előtt a vizsgált vegyi anyaggal kapcsolatos minden rendelkezésre álló információt figyelembe kell vennie. Ilyen információk a vegyi anyag megjelölése és szerkezete; fizikai-kémiai tulajdonságai; bármely más, a vegyi anyaggal elvégzett *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei; szerkezetileg rokon vegyi anyagok toxikológiai adatai és a vegyi anyag várható alkalmazása(i). Ezekre az információkra azért van szükség, hogy minden érintett meggyőződjön arról, hogy a vizsgálat releváns az emberi egészség védelme szempontjából, és elősegíti majd a megfelelő kezdődózis kiválasztását.

▼M5

A VIZSGÁLAT ELVE

5. A vizsgált vegyi anyagot vemhesség és szoptatás alatt adjuk be az állatoknak. Az anyaállatokat a vemhes és szoptató nőstényekre gyakorolt hatások értékelése céljából teszteljük, illetve az anyaállatok összehasonlító információval is szolgálhatnak (az anyaállatok összehasonlítása az utódokkal). Az utódokat a neurotoxicitási értékeléshez véletlenszerűen választjuk ki az almokból. Az értékelés egyrészt a súlyos neurológiai és viselkedési rendellenességek észlelését célzó megfigyelésekből áll, beleértve a fizikai fejlődés, a viselkedési egyedfejlődés, a motoros aktivitás, a motoros és szenzoros funkció, másrészt a tanulás és a memória értékelését, valamint az agytömeg és a neuropatológia posztnatális fejlődés és felnőttkor során történő értékeléséből.

6. Amikor a vizsgálati módszert külön vizsgálatként hajtjuk végre, a csoportokban rendelkezésre álló további állatokat fel lehet használni meghatározott idegrendszeri, neuropatológiai, neurokémiai vagy elektrofiziológiai eljárásokhoz, amelyek kiegészíthetik a vizsgálati módszer által ajánlott vizsgálatokból kapott adatokat (16) (19) (20) (21). A kiegészítő eljárások különösen akkor lehetnek hasznosak, ha az empirikus megfigyelés, a várható hatások, illetve a hatásmechanizmus egy bizonyos típusú neurotoxicitásra utalnak. Ezeket a kiegészítő eljárásokat az anyaállatokban és az utódokban egyaránt használni lehet. Ezen kívül *ex vivo* vagy *in vitro* eljárások is használhatók, mindaddig, amíg ezek az eljárások nem változtatják meg az *in vivo* eljárások integritását.

ELŐKÉSZÜLET A VIZSGÁLATHOZ

Az állatfaj kiválasztása

7. Az elsődleges vizsgálandó faj a patkány, de más faj is használható, ha megfelelő. Megjegyzendő azonban, hogy a vizsgálati módszerben meghatározott vemhességi és posztnatális napok az általánosan használt patkánytörzsekre vonatkoznak, és összehasonlítható időtartamokat kell választani, ha másik állatfajt vagy szokatlan törzset használunk. Más állatfaj használatát toxikológiai, farmakokinetikai és/vagy más adatokkal kell megindokolni. Az indoklásnak tartalmaznia kell a rendelkezésre álló fajspecifikus posztnatális idegrendszeri és neuropatológiai értékeléseket. Ha volt olyan korábbi vizsgálat, amely aggodalomra adott okot, meg kell fontolni az abban alkalmazott faj/törzs használatát. Mivel a különböző patkánytörzsek teljesítőképessége eltérő, bizonyítani kell, hogy a használatra kiválasztott törzs megfelelő termékenységgel és válaszképességgel rendelkezik. Az egyéb fajoknak a fejlődési neurotoxicitás kimutatásával kapcsolatos megbízhatóságát és érzékenységét dokumentumokkal kell alátámasztani.

Tartási és etetési körülmények

8. A kísérleti állatokat 22 ± 3 °C hőmérsékletű helyiségben kell tartani. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50 és 60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. A párzás előtt és a vizsgálat időtartama alatt meg lehet fordítani a fényciklust annak érdekében, hogy a funkcionális és viselkedési végpontok értékelését a sötét periódus alatt lehessen elvégezni (piros fény alatt), *vagyis* abban az időszakban, amikor az állatok rendszerint aktívak (22). A világos-sötét ciklus bármilyen megváltoztatásának magában kell foglalnia egy megfelelő akklimatizációs időt ahhoz, hogy az állatok alkalmazkodjanak az új ciklushoz. Az etetéshez hagyományos laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány és a víz típusát fel kell jegyezni, és mindkettőt meg kell vizsgálni szennyező anyagokra.

▼M5

9. Az állatok egyedileg vagy azonos ivarú egyedekből álló kisebb csoportokban is tarthatók. A pároztatást erre a célra alkalmas ketrecekben kell végezni. Miután meggyőződtek a párzás megtörténtéről, vagy a vemhesség 15. napjánál nem később a pároztatott nőstényeket egyedileg kell elhelyezni ellető vagy fialtató ketrecekben. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezésének lehetséges hatásait. Az ellés közeledtével a pároztatott nőstények számára megfelelő és meghatározott fészekrakó anyagot kell biztosítani. Jól ismert, hogy a vemhesség során a nem megfelelő bánásmód vagy a stressz nem kívánatos kimenetelekhez vezethet, ideértve a prenatális veszteségeket és a megváltozott magzati és posztnatális fejlődést. A kezeléssel nem összefüggő tényezők miatti magzati veszteség kivédése érdekében az állatokkal óvatosan kell bánni a vemhesség alatt, valamint kerülni kell a külső tényezők, így például a túlzott külső zaj miatti stresszt.

Az állatok előkészítése

10. A laboratóriumi körülményekhez hozzászoktatott, korábban vizsgálatban még részt nem vett, egészséges állatokat kell használni, kivéve, ha a vizsgálatot beépítjük egy másik vizsgálatba (lásd a 3. bekezdést). A kísérleti állatokat faj, törzs, eredet, nem, testtömeg és életkor szerint kell jellemezni. Minden állatot egyedi azonosító számmal kell ellátni. Amennyire csak megoldható, az állatok az összes vizsgálati csoportban legyenek azonos testtömegűek és korúak, illetve a vizsgálatban részt vevő fajra és törzsre jellemző normál tartományba essenek. Minden dózishoz még egyszer sem ellett, fiatal felnőtt nőstényeket kell használni. Gondosan ügyelni kell arra, hogy testvéreket nem szabad pároztatni. A vemhesség 0. napja az, amikor hüvelydugó és/vagy sperma észlelhető. Megfelelő akklimatizációs időt (pl. 2–3 nap) kell biztosítani, ha meghatározott ideje vemhes állatokat vásárolnak a szállítótól. A pároztatott nőstényeket megkülönböztetés nélkül kell a kontroll- és a kezelési csoportokba beosztani, és a lehetőségekhez mérten egyenletesen kell elosztani a csoportok között (pl. ajánlott a rétegzett random eljárás, amely egyenletes eloszlást biztosít a csoportok között, például a testtömeg alapján). Az azonos hímmel pároztatott nőstényeket egyenletesen kell szétosztani a különböző csoportokban.

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

11. Minden kísérleti és kontrollcsoportnak elegendő számú vemhes, a vizsgált vegyi anyaggal kezelendő nőstényt kell tartalmaznia, hogy megfelelő számú utódot termeljenek a neurotoxicitási értékeléshez. Összesen 20 alom használata ajánlott minden dózisszinthez. A párhuzamos és lépcsőzetes csoport adagolási tervek akkor használhatók, ha a csoportonkénti teljes alomszámot elértük, és megfelelő statisztikai modelleket alkalmazunk az ismétlések elszámolására.

12. A 4. posztnatális napon (PND) vagy azt megelőzően (az ellés napja a PND 0) minden alom méretét ki kell igazítani az extra kölykök véletlenszerű kiválasztás útján történő kiküszöbölésével, és egységes alomméretet kell kialakítani minden alomban (23). Az alom mérete nem haladhatja meg a használt rágcsálótörzsre jellemző átlagos alomméretet (8–12). Az almoknak a lehetőségekhez mérten azonos számú hím és nőstény kölyökből kell állniuk. A kölykök szelektív eltávolítása, pl. a testtömeg alapján, nem elfogadható. Az almok standardizálása (selejtezés) után és a funkcionális végpontok vizsgálatát megelőzően az elválasztás előtti vagy elválasztás utáni vizsgálatra szánt kölyköket egyedi azonosítóval kell ellátni a kölykök azonosítására alkalmas bármely humánus módszer használatával (pl. 24).

▼M5

Az állatok besorolása a funkcionális és viselkedési tesztekbe, az agytömeg mérésébe és a neuropatológiai értékelésekbe

13. A vizsgálati módszer különböző megközelítéseket tesz lehetővé az *in utero* és a szoptatás útján kezelt állatoknak a funkcionális és viselkedési tesztekhez, a szexuális éréshez, az agytömeg meghatározásához és a neuropatológiai értékeléshez való hozzárendelése tekintetében (25). Egyéb, az idegrendszeri funkciót (pl. szociális viselkedés) értékelő, illetve neurokémiai vagy neuropatológiai vizsgálatokat lehet hozzáadni eseti elbírálás alapján, amíg ezek az eredetileg előírt vizsgálatok integritását nem veszélyeztetik.

14. Minden egyes dóziscsoportból kölyköket kell kiválasztani és hozzárendelni a 4. posztnatális napon (PND 4) vagy azt követően elvégzendő végpont-értékelésekhez. A kölykök kiválasztását úgy kell elvégezni, hogy minden alomból mindkét nem minden adagolási csoportban lehetőleg egyenlő arányban képviselve legyen az összes tesztben. A motoros aktivitás vizsgálata során ugyanazokat a hím és nőstény kölyökpárokat kell megvizsgálni az elválasztást megelőző minden életkorban (lásd a 35. bekezdést). Az egyéb vizsgálatok során azonos vagy különböző hím és nőstény párokat lehet hozzárendelni a különböző viselkedési tesztekhez. Különböző kölykök hozzárendelése lehet szükséges az elválasztott kölykök és a felnőtt egyedek kognitív funkciójának vizsgálataihoz annak érdekében, hogy kiküszöbölhető legyen az életkor és a korábbi képzés zavaró hatása ezekre a mérésekre (26) (27). Az elválasztáskor (PND 21) a vizsgálatra ki nem választott kölykök humánus módon eltávolíthatók. A kölykök elosztásának minden módosítását fel kell jegyezni. A statisztikai mértékegység az alom (vagy az anyaállat) és nem a kölyök.

15. A kölykök különböző módokon sorolhatók be az elválasztás előtti és elválasztás utáni vizsgálatokba, a kognitív tesztekbe, a patológiai vizsgálatokba, stb. (lásd az 1. ábrát az általános elrendezéssel és az 1. függeléket a besorolási példákkal). Az állatok javasolt minimális száma az elválasztás előtti és elválasztás utáni vizsgálatok egyes dóziscsoportjaiban a következő:

Klinikai megfigyelések és testtömeg	Minden állat
Részletes klinikai megfigyelések	20/nem (1/nem/alom)
Agytömeg (fixálás után) PND 11-22	10/nem (1/alom)
Agytömeg (fixálatlan) ~ PND 70	10/nem (1/alom)
Neuropatológia (immerziós vagy perfúziós fixálás) PND 11-22.	10/nem (1/alom)
Neuropatológia (perfúziós fixálás) PND ~70.	10/nem (1/alom)
Nemi érés	20/nem (1/nem/alom)
Egyéb fejlődési tájékozódási pontok (választható)	Minden állat
Viselkedési egyedfejlődés	20/nem (1/nem/alom)
Motoros aktivitás	20/nem (1/nem/alom)
Motoros és szenzoros funkció	20/nem (1/nem/alom)
Tanulás és memória	10/nem ([a]) (1/alom)

([a]) A kognitív funkció vizsgálatok érzékenységétől függően meg kell fontolni nagyobb számú állat vizsgálatát, pl. 1 hím és 1 nőstény állat vizsgálatát almonként (az állatok hozzárendelésével kapcsolatban lásd az 1. függeléket) (a minta méretével kapcsolatos további útmutatás az OECD 43. iránymutatásában található).

▼M5

Adagolás

16. Legalább három dózisszintet és egy párhuzamos kontrollt kell alkalmazni. A dózisszinteket úgy kell megválasztani, hogy biztosítsák a kiváltott toxikus hatások fokozatosságát. Hacsak a vegyi anyag fizikai-kémiai jellege vagy biológiai tulajdonságai nem szabnak ennek határt, a legmagasabb adagolási szintet úgy kell megválasztani, hogy némi anyai toxicitást is kiváltson (pl. klinikai tünetek, csökkent testtömegnövekedés (legfeljebb 10 %) és/vagy dózis-korlátozó toxicitásra utaló bizonyíték a célszervben). A magas dózist 1 000 mg/ttkg/nap értékre lehet korlátozni, néhány kivételtől eltekintve. Például a várható humán expozíció magasabb dózis alkalmazását teheti szükségessé. Alternatívaként előzetes vizsgálatokat vagy előzetes dózisbehatároló vizsgálatokat kell végezni, hogy meghatározzuk az alkalmazandó legmagasabb dózist, amelynek minimális fokú anyai toxicitást is ki kell váltania. Ha a vizsgált vegyi anyagról standard fejlődési toxicitási vizsgálatban vagy előzetes vizsgálatban kimutatták, hogy fejlődési toxicitást okoz, legmagasabb dózisként azt a maximális dózist kell választani, amely az utódokban nem vált ki túlzott toxicitást, *in utero* vagy neonatális elhullást, illetve fejlődési rendellenességeket, mivel ezek kizárják a neurotoxicitás értelmezhető értékelését. A legalacsonyabb dózist úgy kell megválasztani, hogy semmilyen anyai vagy fejlődési toxicitásra utaló tünetet ne okozzon, ideértve a neurotoxicitást is. Fokozatosan csökkenő dózisszinteket kell választani azzal a céllal, hogy demonstrálni lehessen a dózisfüggő hatásokat és a megfigyelhető káros hatást nem okozó szintet (NOAEL), illetve a kimutatási határ közelében lévő dózisokat, amelyek lehetővé teszik a benchmark dózis meghatározását. A csökkenő dózisszintek meghatározásához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása, a dózisok közötti nagyon nagy intervallumok (pl. 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazása esetén pedig gyakran előnyös egy negyedik dóziscsoport beiktatása is.

17. A dózisszintek megválasztásakor figyelembe kell venni mind a rendelkezésre álló összes toxicitási adatot, mind a vizsgált vegyi anyag vagy a rokon anyagok metabolizmusával vagy toxikokinetikájával kapcsolatos további információkat. Ezek az információk segíthetik az adagolási rend megfelelőségének igazolását is. A kölyköknek történő közvetlen adagolást az expozíció és farmakokinetikai információk alapján kell mérlegelni (28) (29). A közvetlen adagolásos vizsgálatok előtt gondosan mérlegelni kell az előnyöket és a hátrányokat (30).

18. A kísérő kontrollcsoport egy placebóval kezelt kontrollcsoport, vagy ha a vizsgált vegyi anyag beadásához vivőanyagot használnak, akkor egy vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport. Minden állatnak ugyanolyan térfogatú vizsgált vegyi anyagot vagy vivőanyagot kell beadni a testtömeg alapján. Ha a beadás megkönnyítése érdekében vivőanyagot vagy más adalékot alkalmazunk, a következő jellemzőket kell figyelembe venni: a vizsgált vegyi anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára vagy visszatartására gyakorolt hatások; a vizsgált vegyi anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt hatások, amelyek megváltoztathatják annak toxikus jellemzőit; valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások. A vivőanyag nem okozhat olyan hatásokat, amelyek zavarhatják a vizsgálat értelmezését, nem okozhat idegrendszeri toxicitást, és nem lehet hatással a reprodukcióra vagy a fejlődésre. Újfajta vivőanyagok esetében a vivőanyaggal kezelt kontrollcsoporton felül egy placebóval kezelt kontrollcsoportot is be kell iktatni. A kontrollcsoport(ok)ba tartozó állatokat ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket.

▼M5

A dózisok beadása

19. A vizsgált vegyi anyagot és a vivőanyagot olyan úton kell beadni, amely a leginkább megközelíti a lehetséges emberi expozíciót, valamint amely a kísérleti állatok vonatkozásában rendelkezésre álló anyagcsere és eloszlási információkon alapul. A beadás általában szájon át történik (pl. gyomorszonda, táplálék, ivóvíz), de egyéb módok (pl. bőr, inhaláció) is használhatók az anyag jellegétől és a várható vagy ismert emberi expozíciós utaktól függően (további útmutatás a 43. iránymutatásban található (8)). A választott beadási módra vonatkozó döntést indokolni kell. A vizsgált vegyi anyagot minden nap körülbelül ugyanabban az időpontban kell beadni.

20. Az egyes állatoknak beadandó dózist általában a legutóbbi testtömegmérés eredménye alapján kell meghatározni. A vemhesség utolsó harmadában azonban óvatosan kell eljárni a dózis beállításakor. Ha túlzott toxicitást észlelünk a kezelt anyaállatokban, akkor azokat humánus módon exterminálni kell.

21. A vizsgált vegyi anyagot vagy vivőanyagot minimálisan naponta kell beadni a pároztatott nőstényeknek az implantáció időpontjától (GD 6) kezdve a szoptatás egész időtartama alatt (PND 21) annak érdekében, hogy a kölyköket kitegyék a vizsgált vegyi anyagnak a pre- és posztnatális idegrendszeri fejlődés időszaka alatt. Azt az életkort, amikor az adagolás megkezdődik, illetve az adagolás időtartamát és gyakoriságát módosítani lehet, ha a bizonyítékok egy olyan kísérleti elrendezést támasztanak alá, amely relevánsabb az emberi expozíció szempontjából. Az adagolási időtartamokat hozzá kell igazítani az egyéb állatfajokhoz, hogy biztosítani lehessen az expozíciót az agy fejlődésének minden korai időszakában (ami egyenértékű az emberi agy prenatális és korai posztnatális növekedésével). Az adagolás indulhat a vemhesség kezdetétől (GD 0), habár figyelembe kell venni, hogy a vizsgált vegyi anyag preimplantációs veszteséget okozhat. Az adagolásnak a vemhesség 6. napján (GD 6) történő megkezdésével elkerülhető ez a kockázat, ebben az esetben azonban a 0. és 6. GD közötti fejlődési szakaszok kezelése elmarad. Ha a laboratórium külső forrásból adott időben pároztatott állatokat vásárol, akkor az adagolás megkezdése nem kivitelezhető a pároztatás napján (GD 0), és így a GD 6 jó kezdőnap lehet. A vizsgáló laboratóriumnak az adagolási rendet a vizsgált vegyi anyag hatásaira vonatkozó lényeges információk, a korábbi tapasztalatok és a logisztikai szempontok alapján kell megállapítania; ez magában foglalhatja az adagolásnak az elválasztás utáni időszakra történő kiterjesztését is. Nem kezelhetők az ellés napján azok az állatok, amelyek még nem teljesen ellették meg az utódaikat. Általában azt feltételezzük, hogy a kölykök expozíciója az anyatej útján fog megtörténni; meg kell azonban fontolni a kölykök közvetlen kezelését is azokban az esetekben, ahol hiányoznak az utódok folyamatos expozícióját alátámasztó bizonyítékok. Folyamatos expozícióra utaló bizonyítékok nyerhetők *pl.* a farmakokinetikai információkból, az utódokban jelentkező toxicitásból vagy a biomarkerek változásaiból (28).

MEGFIGYELÉSEK

Az anyaállatok megfigyelése

22. Az anyaállatok egészségi állapotát legalább naponta egyszer gondosan meg kell figyelni, ideértve a megbetegedéseket és elhullásokat.

23. A kezelési és megfigyelési időszak során rendszeresen részletesebb klinikai megfigyeléseket is végezni kell (legalább kétszer a vemhességi adagolási időszak alatt és kétszer a laktációs adagolási periódus alatt), dózisszintenként legalább tíz anyaállatban. Az állatokat az otthonul szolgáló ketrecen kívül olyan képzett technikusnak kell megfigyelnie, aki nincs tisztában az állatok kezelésének részleteivel és standardizált eljárásokat alkalmaz annak érdekében, hogy az állatokat érő stresszt és a megfigyelő elfogultságát minimalizálni, a megfigyelők közti megbízhatóságot pedig maximalizálni lehessen. Ahol lehetséges, célszerű, hogy egy adott vizsgálat megfigyeléseit ugyanaz a technikus végezze.

▼M5

24. A megfigyelt tüneteket fel kell jegyezni. Ha megoldható, a megfigyelt tünetek erősségét is fel kell jegyezni. A klinikai megfigyelések többek között a bőr, a szőrzet, a szemek, a nyálkahártyák változásaira, szekrétumok és autonóm aktivitás megjelenésére (*pl.* könnyezés, szőrmeredezés, pupillaméret, szokatlan légzési mintázat és/vagy szájon át történő légzés, szokatlan vizelés vagy székletürítés) irányuljanak.

25. Rögzíteni kell továbbá a testhelyzettel, aktivitási szinttel (pl. a standard terület csökkent vagy fokozott felderítése) és a mozgáskoordinációval kapcsolatos összes szokatlan választ is. A járás (pl. kacsázás, ataxia), a testtartás (pl. púpos tartás) és a megfogásra, elhelyezésre vagy más környezeti ingerekre adott reakció megváltozását, valamint a rángásos vagy görcsös mozgásokat, görcsös vonaglásokat, remegéseket, sztereotípiákat (pl. túlzott tisztálkodást, szokatlan fejmozgásokat, ismétlődő körbejárást), bizarr viselkedést (pl. harapást vagy túlzott nyalogatást, öncsonkítást, hátrafelé menést, hangadást) vagy agressziót is fel kell jegyezni.

26. A toxicitás tüneteit gondosan fel kell jegyezni, beleértve kialakulásuk napját és időpontját, a súlyosságot és az időtartamot.

27. Az állatokat a vizsgálat időtartama alatt legalább hetente egyszer meg kell mérni az adagoláskor, illetve az ellés napján vagy annak környékén, valamint a 21. posztnatális napon (PND 21) is (elválasztás). A gyomorszondával végzett vizsgálatok esetében az anyaállatokat legalább hetente kétszer kell megmérni. A dózist szükség esetén minden egyes testtömeg-meghatározás alkalmával be kell állítani. A táplálékfogyasztást legalább hetente kell mérni a vemhesség és a szoptatás alatt. A vízfogyasztást is legalább hetente kell mérni, ha az expozíció a vízellátáson keresztül történik.

Az utódok megfigyelése

28. Minden utódot legalább naponta gondosan meg kell figyelni a toxikus hatások, valamint a morbiditás és mortalitás észlelése céljából.

29. A kezelési és megfigyelési időszak során részletesebb klinikai megfigyeléseket is végezni kell az utódokon. Az utódokat (nemenként és almonként legalább 1 kölyköt) képzett technikusnak kell megvizsgálnia, aki nincs tisztában az állatok kezelésével és standardizált eljárásokat alkalmaz annak érdekében, hogy a megfigyelő elfogultságát minimalizálni, a megfigyelők közti megbízhatóságot pedig maximalizálni lehessen. Ahol lehetséges, célszerű, hogy a megfigyeléseket ugyanaz a technikus végezze. A megfigyelt fejlődési fázisnak megfelelően legalább a 24. és 25. bekezdésben leírt végpontokat ellenőrizni kell.

30. A toxicitás utódokban jelentkező minden tünetét gondosan fel kell jegyezni, beleértve a kialakulás napját és időpontját, a súlyosságot és az időtartamot.

Testi és fejlődési tájékozódási pontok

31. Az elválasztás előtti fejlődési tájékozódási pontok (pl. fülkagyló kitárulása, szem kinyílása, metszőfog előtörése) erősen korrelálnak a testtömeggel (30) (31). A testi fejlődés legjobb mutatója a testtömeg lehet. A fejlődési tájékozódási pontok mérése ezért csak akkor ajánlott, ha van korábbi bizonyíték arra, hogy ezek a végpontok további információkat nyújtanak. A fenti paraméterek értékelésének időzítése az 1. táblázatban látható. A várható hatásoktól és a kezdeti mérések eredményeitől függően tanácsos lehet további időpontokat hozzáadni, vagy a méréseket más fejlődési szakaszokban elvégezni.

▼M5

32. A testi fejlődés értékelésekor célszerű a posztnatális életkor helyett a poszt-koitális életkort használni (33). Ha a kölyköket az elválasztás napján vizsgáljuk, akkor ajánlott ezt a vizsgálatot a tényleges elválasztás előtt elvégezni, hogy kiküszöbölhető legyen az elválasztással járó stressz zavaró hatása. Ezenkívül a kölykök elválasztás utáni vizsgálatára nem kerülhet sor az elválasztást követő két napban.

1. táblázat

A testi és fejlődési tájékozódási pontok és a funkcionális/viselkedési végpontok értékelésének ütemezése ([a])

Életkori szakaszok / Végpontok	Elválasztás előtt ([b])	Serdülőkor ([b])	Fiatal ivarérett egyedek ([b])
Testi és fejlődési tájékozódási pontok			
Testtömeg és klinikai megfigyelések	hetente ([c])	legalább minden két hétben	legalább minden két hétben
Agytömeg	PND 22 ([d])		befejezéskor
Neuropatológia	PND 22 ([d])		befejezéskor
Nemi érés	—	szükség szerint	—
Egyéb fejlődési tájékozódási pontok ([e])	szükség szerint	—	—
Funkcionális/viselkedési végpontok			
Viselkedési egyedfejlődés	legalább két mérés		
Motoros aktivitás (beleértve a habituációt)	1-3 alkalommal ([f])	—	egyszer
Motoros és szenzoros funkció	—	egyszer	egyszer
Tanulás és memória	—	egyszer	egyszer

([a]) Ez a táblázat azt a minimális számú alkalmat adja meg, amikor méréseket kell végezni. A várható hatásoktól és a kezdeti mérések eredményeitől függően tanácsos lehet további időpontokat hozzáadni (pl. idős állatok), vagy a méréseket más fejlődési szakaszokban elvégezni.

([b]) A kölykök vizsgálata az elválasztás utáni két napban nem javasolt (lásd a 32. bekezdést). A serdülő állatok tesztelésére ajánlott életkorok: tanulás és memória = PND 25 ± 2; motoros és szenzoros funkció = PND 25 ± 2. A fiatal ivarérett egyedek tesztelésére ajánlott életkor PND 60-70.

([c]) A testtömegeket legalább hetente kétszer kell mérni, amikor a gyors testtömeg-gyarapodás időszakában a kölykök közvetlen adagolást kapnak a dózis beállítása céljából.

([d]) Az agytömegeket és a neuropatológiai elváltozásokat adott esetben egy korábbi időpontban is lehet értékelni (pl. PND 11) (lásd a 39. bekezdést).

([e]) A testtömeg mellett egyéb fejlődési tájékozódási pontokat is rögzíteni kell (pl. szem kinyílása), ha szükséges (lásd a 31. bekezdést).

([f]) Lásd a 35. bekezdést.

33. Az élő kölyköket meg kell számolni és a nemüket meg kell állapítani pl. vizuális vizsgálattal vagy az anogenitális távolság mérésével (34) (35), illetve az alomban lévő valamennyi kölyköt egyenként meg kell mérni a születéskor vagy nem sokkal azt követően, valamint legalább hetente egyszer a szoptatási időszak alatt, és azt követően legalább kéthetente egyszer. A szexuális érés értékelése céljából a hüvelykinyílás (36) vagy fitymaelválás (37) jelentkezésekor almonként legalább egy hím és egy nőstény korát és testtömegét meg kell határozni.

▼M5

Viselkedési egyedfejlődés

34. A kiválasztott viselkedések egyedfejlődését a megfelelő életkorban, almonként és ivaronként legalább egy kölykön kell mérni, ugyanazokat a kölyköket használva valamennyi vizsgálati napon az összes értékelt viselkedés vizsgálatára. A mérési napokat egyenletesen kell elosztani ebben az időszakban, hogy meghatározható legyen az adott magatartás egyedfejlődésének normál vagy a kezeléssel összefüggő változása (38). Néhány példa azokra a viselkedésekre, amelyek egyedfejlődését értékelni lehet: felegyenesedési reflex, negatív geotaxis és motoros aktivitás (38) (39) (40).

Motoros aktivitás

35. A motoros aktivitást (41) (42) (43) (44) (45) az elválasztás előtti időszakban és felnőtt korban egyaránt monitorozni kell. Az elválasztás idején történő vizsgálat tekintetében lásd a 32. bekezdést. A vizsgálatnak elegendő ideig kell tartania ahhoz, hogy demonstrálni lehessen a tesztmenet alatti habituációt a nem kezelt kontrollok esetében. Erősen ajánlott a motoros aktivitás használata a viselkedési egyedfejlődés értékelésére. Ha a viselkedési egyedfejlődés vizsgálatára használjuk, akkor a vizsgálathoz ugyanazokat az állatokat kell használni minden elválasztás előtti tesztmenet esetén. A vizsgálatnak elég gyakorinak kell lennie ahhoz, hogy értékelni lehessen a tesztmenet alatti habituáció egyedfejlődését (44). Ehhez három vagy több időpontra lehet szükség az elválasztást megelőzően, az elválasztás napját is beleértve (pl. PND 13, 17, 21). Ugyanezen állatok vagy alomtársaik vizsgálatára felnőtt korban is sort kell keríteni, a vizsgálat befejezésének időpontja környékén (pl. PND 60-70). Vizsgálatot további napokon is lehet végezni, amennyiben szükséges. A motoros aktivitást olyan automatizált aktivitásrögzítő készülékkel kell monitorozni, amely egyaránt képes észlelni az aktivitás növekedését és csökkenését (*vagyis* a kiindulási aktivitás az eszközzel mérve ne legyen olyan alacsony, hogy kizárja az aktivitás csökkenésének kimutatását, és ne legyen olyan magas, hogy kizárja az aktivitás növekedésének kimutatását). Minden eszközt olyan standard eljárásokkal kell bevizsgálni, amelyek a lehető legnagyobb mértékben garantálják a különböző eszközök folyamatos és megbízható működését. A kezelési csoportokat a lehetséges mértékben kiegyensúlyozottan kell szétosztani a készülékek között. Minden állatot egyedileg kell megvizsgálni. A kezelési csoportokat ellensúlyozni kell a vizsgálati időpontok között, hogy kiküszöbölhető legyen az aktivitás cirkadián ritmusának zavaró hatása. Törekedni kell arra, hogy minimálisak legyenek a kísérleti körülmények közötti eltérések és ne legyenek szisztematikus összefüggésben a kezeléssel. Változók, amelyek hatással lehetnek a viselkedés számos mutatójára, beleértve a motoros aktivitást is: zajszint, a vizsgálati ketrec mérete és alakja, hőmérséklet, relatív páratartalom, fényviszonyok, szagok, az otthoni ketrec vagy új vizsgálati ketrec használata és zavaró környezeti tényezők.

Motoros és szenzoros funkció

36. A motoros és szenzoros funkciót legalább egyszer részletesen meg kell vizsgálni a serdülő időszakban és egyszer a fiatal felnőtt időszakban is (pl. PND 60-70). Az elválasztás idején történő vizsgálatra vonatkozóan lásd a 32. bekezdést. Elegendő vizsgálatot kell végezni annak érdekében, hogy megfelelő kvantitatív mintavételre kerüljön sor a szenzoros módozatok (pl. szomato-szenzoros, vesztibuláris) és a motoros funkciók (pl. erő, koordináció) értékeléséhez. Néhány példa a motoros és szenzoros funkció vizsgálataira: extenzor tolóerő válasz (46), felegyenesedési reflex (47) (48), riasztó hanghatásokhoz való hozzászokás (40) (49) (50) (51) (52) (53) (54), kiváltott potenciálok (55).

▼M5

Tanulási és memóriatesztek

37. Az asszociatív tanulási és memóriatesztet az elválasztás után (pl. 25 ± 2 nap) és fiatal felnőttkorban (PND 60 és idősebb) kell elvégezni. Az elválasztás idején történő vizsgálat tekintetében lásd a 32. bekezdést. Ebben a két fejlődési szakaszban ugyanazt a vizsgálatot vagy különböző vizsgálatokat is lehet végezni. Az elválasztott és felnőtt patkányok esetében a tanulási és memóriavizsgálatok kiválasztásakor bizonyos fokú rugalmasság megengedett. A vizsgálatokat azonban úgy kell kialakítani, hogy azok megfeleljenek két kritériumnak. Egyrészt a tanulást egy több ismételt tanulási próba vagy szakasz során kialakuló változásként, vagy – az egyetlen próbát tartalmazó vizsgálatokban – egy olyan feltételre hivatkozva kell értékelni, amely a tanulási tapasztalat nem asszociatív hatását szabályozza. Másrészt a vizsgálatoknak az eredeti tanulás (akvizíció) mellett tartalmazniuk kell némi memóriamérést is (rövidtávú vagy hosszú távú), de ezt a memóriamérést az ugyanebből a vizsgálatból nyert akvizíció hiányában nem kell jelenteni. Amennyiben a tanulási és memóriatesztek kimutatják a vizsgált vegyi anyag hatását, mérlegelni kell további vizsgálatok elvégzését az érzékszervi, motivációs és/vagy a motoros képességek változásain alapuló alternatív értelmezések kizárása érdekében. A fenti két kritérium mellett ajánlott a tanulási és memóriatesztet a vizsgálat alatt álló vegyi anyag osztályával szemben igazolt érzékenység alapján kiválasztani, amennyiben ilyen információ rendelkezésre áll a szakirodalomban. Ilyen információ hiányában néhány példa azokra a vizsgálatokra, amelyeket átalakíthatók úgy, hogy megfeleljenek a fenti szempontoknak: passzív elkerülés (43) (56) (57), ‘delayed-matching-to-position’ vizsgálat felnőtt patkányok (58) és napos patkányok esetén (59), olfaktorikus kondicionálás (43) (60), Morris-féle vízi labirintus (61) (62) (63), Biel- vagy Cincinnati-labirintus (64) (65), radiális kar labirintus (66), T-labirintus (43), menetrend-vezérelt viselkedés megszerzése és megtartása (26) (67) (68). Az elválasztott (26) (27) és a felnőtt patkányok esetében (19) (20) az irodalom további vizsgálatokat ír le.

Post mortem vizsgálat

38. Az anyaállatokat az utódok leválasztása után lehet elaltatni.

39. Az utódok neuropatológiai értékelését a 22. posztnatális napon (PND 22) vagy egy korábbi, a 11. és 22. posztnatális nap (PND 11 és PND 22) közötti időpontban, valamint a vizsgálat befejezésekor humánusan exterminált állatokból származó szöveteken kell elvégezni. A 22. posztnatális napon (PND 22) elpusztított utódok esetében az agyi szöveteket kell értékelni; a vizsgálat befejezésekor elpusztított állatok esetében a központi idegrendszeri (CNS) és a perifériás idegrendszeri (PNS) szövetmintákat is ki kell értékelni. A 22. posztnatális napon (PND 22) vagy korábban elpusztított állatokat immerzióval vagy perfúzióval lehet fixálni. A vizsgálat befejezésekor elpusztított állatokat perfúzióval kell fixálni. A szövetminták előkészítésének valamennyi lépése során, az állatok perfúziójától kezdve a szövetminták kimetszésén és a szövetek feldolgozásán át a metszetek festéséig, kiegyensúlyozott elrendezést kell alkalmazni úgy, hogy minden tételnek minden dóziscsoportból tartalmaznia kell reprezentatív mintákat. A neuropatológiára vonatkozó további útmutatás az OECD 20. iránymutatásában található (9), lásd még (103).

A szövetminták feldolgozása

40. A már a boncolás során nyilvánvaló súlyos rendellenességeket fel kell jegyezni. A szövetmintáknak az idegrendszer összes főbb régióját reprezentálniuk kell. A szövetmintákat megfelelő fixálóban kell tartani és a publikált standard szövettani protokolloknak megfelelően kell feldolgozni (69) (70) (71) (103). A paraffin-beágyazás elfogadható a központi idegrendszerből és a perifériás idegrendszerből származó szövetek esetében, de fixálás után

▼M5

ajánlott lehet az ozmium használata epoxi-beágyazással kombinálva, amennyiben magasabb felbontásra van szükség (pl. perifériás idegek esetében, ha perifériás neuropátia gyanúja merül fel és/vagy a perifériás idegek morfometriai analízise céljából). A morfometriai analízis céljára gyűjtött agyszöveteket minden dózisszinten egyidejűleg kell a megfelelő közegbe ágyazni annak érdekében, hogy elkerüljék a zsugorodási műtermékek kialakulását, amelyek a fixálószerben való hosszabb tároláshoz társulhatnak (6).

Neuropatológiai vizsgálatok

41. A kvalitatív vizsgálat céljai:

i. a neuropatológiai változásokat mutató régiók beazonosítása az idegrendszeren belül;

ii. a vizsgált vegyi anyaggal történt expozícióból eredő neuropatológiai elváltozások típusainak meghatározása; és

iii. a neuropatológiai változások súlyossági tartományának meghatározása.

A neuropatológiai elváltozások kimutatása céljából a szövetminták reprezentatív szövettani metszeteinek mikroszkópos vizsgálatát megfelelően képzett patológusnak kell elvégeznie. Minden neuropatológiai elváltozáshoz hozzá kell rendelni egy szubjektív fokot, amely az elváltozás súlyosságát jelzi. A hematoxilin-eozin festés elegendő lehet a 22. posztnatális napon (PND 22) vagy korábban humánusan exterminált állatok agyi metszeteinek kiértékelésére. A vizsgálat befejezésekor elpusztított állatokból származó központi és perifériás idegrendszeri metszetek esetében azonban a myelin festés (pl. Luxol Fast Blue/krezilibolya) vagy az ezüst festés (pl. Bielschowsky- vagy Bodians-festés) ajánlott. Figyelembe véve a patológus szakmai értékelését és a megfigyelt elváltoztatások jellegét, egyéb festési módszerek alkalmazása is megfelelőnek tekinthető bizonyos típusú elváltozások azonosítása és jellemzése céljából (pl. gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) vagy lektin hisztokémia a gliális és mikrogliális elváltozások értékelésére (72), fluoro-jade festés a nekrózis kimutatására (73) (74), vagy ezüst festés a specifikus idegi degeneráció kimutatására (75)).

42. Morfometriai (mennyiségi) értékelést kell végezni, mivel ezek az adatok segíthetnek a kezeléssel összefüggő hatások kimutatásában és értékes segítséget nyújtanak az agy tömegében vagy morfológiájában a kezeléssel összefüggésben kialakuló különbségek értelmezése során (76) (77). Az idegszöveti mintát úgy kell levenni és előkészíteni, hogy az lehetővé tegye a morfológiai értékelést. A morfometriai értékelések közé tartozik például a specifikus agyi régiók lineáris vagy területi mérése (78). A lineáris vagy területi mérések megbízható mikroszkopikus tájékozódási pontok alapján gondosan kiválasztott homológ metszetek használatát követelik meg (6). Sztereológiát lehet használni a kezelések egyes paraméterekre, mint például bizonyos neuroanatómiai régiók térfogatára vagy sejtjeinek számára gyakorolt hatásainak azonosítására (79) (80) (81) (82) (83) (84).

43. Az agyakat meg kell vizsgálni a kezeléssel összefüggő neuropatológiai elváltozásokra és megfelelő mintákat kell venni minden nagyobb agyi régióból (pl. szaglóhagymák, cerebrális cortex, hippocampus, bazális ganglionok, thalamus, hypothalamus, középagy (tectum, tegmentum, és agyi pedunculusok), híd, nyúltvelő, kisagy) az alapos vizsgálat érdekében. Fontos, hogy a metszeteket az összes állat esetében ugyanabban a síkban kell készíteni. A vizsgálat befejezésekor humánusan elpusztított felnőtt egyedek esetében a gerincvelő és a perifériás idegrendszer reprezentatív részeiből kell mintát venni. A vizsgált területeknek magukban kell foglalniuk a szemet a látóideggel és a retinával, a gerincvelőt a nyaki és ágyéki megvastagodásnál, a dorzális és ventrális ideggyökérrostokat, a proximális ülőideget, a proximális sípcsonti ideget (a térdnél) és a sípcsonti ideg lábikraizom-ágait. A gerincvelőből és a perifériás idegekből készített metszeteknek mind keresztirányú vagy haránt irányú, mind hosszanti metszeteket tartalmazniuk kell.

▼M5

44. A neuropatológiai értékelésnek a celluláris elváltozások (pl. neuronális vakuolizáció, degeneráció, nekrózis) és a szöveti elváltozások (pl. gliózis, leukocita infiltráció, cisztaképződés) vizsgálata mellett magában kell foglalnia az idegrendszert ért fejlődési károsodások vizsgálatát is (6) (85) (86) (87) (88) (89). Ebben a tekintetben fontos, hogy a kezeléssel összefüggő hatásokat meg kell különböztetni a normális fejlődési eseményektől, amelyek az állat elpusztításának időpontjában zajló fejlődési szakaszban előfordulhatnak (90). A fejlődési károsodásokat jelző jelentős elváltozások közé tartoznak egyebek között:

— a szaglóhagymák, a nagyagy és a kisagy bruttó méretének és alakjának megváltozása,

— a különböző agyi régiók relatív méretének változásai, beleértve a régiók méretének a normális körülmények között átmeneti sejtpopulációk vagy axonális projekciók elvesztése vagy fennmaradása miatti csökkenését vagy növekedését (pl. a kisagy külső germinális rétege, corpus callosum),

— a proliferáció, migráció és differenciálódás elváltozásai, amelyet a túlzott mértékű apoptózist vagy nekrózist mutató területek, az ektópiás, dezorientált vagy hibás alakulású neuronok klaszterei vagy szétszórt populációi, illetve az agykérgi struktúrák különböző rétegeinek relatív méretében kialakult módosulások jeleznek,

— a myelinizációs minták elváltozásai, beleértve a myelinhüvelyes struktúrák méretének csökkenését vagy megváltozott festődését,

— hydrocephalusra utaló bizonyíték, különösen a kamrák megnagyobbodása, az agyi vízvezeték szűkülete és az agyféltekék elvékonyodása.

A neuropatológiai elváltozások dózis-válasz összefüggéseinek elemzése

45. A kvalitatív és kvantitatív neuropatológiai analízisek céljára az alábbi többlépcsős eljárás ajánlott. Először a magas dózissal kezelt csoport metszeteit összehasonlítjuk a kontrollcsoport metszeteivel. Ha a magas dózissal kezelt csoportból származó állatokban nem található bizonyíték neuropatológiai elváltozásokra, nincs szükség további analízisre. Ha neuropatológiai elváltozások találhatók a magas dózissal kezelt csoportban, meg kell vizsgálni a közepes és az alacsony dózissal kezelt csoportokból származó állatokat. Ha a magas dózissal kezelt csoportot elhullás vagy más zavaró toxicitás miatt fel kell számolni, a magas és a közepes dózissal kezelt csoportokat meg kell vizsgálni neuropatológiai elváltozásokra. Ha a neurotoxicitás bármilyen jele mutatkozik a kisebb dózissal kezelt csoportokban, neuropatológiai analízist kell végezni. Ha a kvalitatív vagy kvantitatív vizsgálat során a kezeléssel összefüggő neuropatológiai elváltozások mutatkoznak, valamennyi dózis-csoport valamennyi állatának értékelése alapján meg kell határozni az előfordulás dózisfüggését, a léziók vagy morfológiai elváltozások gyakoriságát és súlyossági fokát. Az agy neuropatológiai elváltoztatást mutató valamennyi régióját be kell vonni ebbe az értékelésbe. A léziók minden típusa esetében be kell mutatni az egyes súlyossági fokok meghatározására használt jellemzőket, megjelölve azokat a jellemzőket, amelyek alapján különbséget tettünk az egyes fokozatok között. Az egyes léziók gyakoriságát és súlyosságát fel kell jegyezni, és statisztikai elemzést kell végezni a dózis-hatás összefüggés értékelése céljából. Kóddal ellátott metszetek használata ajánlott (91).

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

46. Az adatokat külön-külön és táblázatos formában összesítve is jegyzőkönyvezni kell, minden egyes vizsgált csoport esetében megjelenítve az elváltozások típusát és az egyes elváltozásokat mutató anyaállatok, utódok (nem szerint) és almok számát. Ha az utódoknál közvetlen posztnatális expozíciót végeztünk, az útvonalat, valamint az expozíció időtartamát és időszakát is jegyzőkönyvezni kell.

▼M5

Az eredmények értékelése és értelmezése

47. A fejlődési neurotoxicitási vizsgálat tájékoztatást nyújt egy vegyi anyaggal az *in utero* és a korai posztnatális fejlődés során történt ismételt expozíció hatásairól. Mivel mind az általános toxicitási, mind pedig a fejlődési neurotoxicitási végpontokra hangsúlyt fektetnek, a vizsgálat eredményei lehetővé teszik az általános anyai toxicitás hiányában is fellépő idegfejlődési hatások megkülönböztetését azoktól, amelyek az anyaállatra is csak toxikus szintek mellett fejeződnek ki. A vizsgálati elrendezésen belüli bonyolult összefüggések, a statisztikai elemzés, illetve az adatok biológiai jelentősége miatt a fejlődési neurotoxicitási adatok megfelelő értelmezéséhez szakértői értékelésre van szükség (107) (109). A vizsgálati eredmények értelmezéséhez a bizonyítékok súlyán alapuló megközelítést kell alkalmazni (20) (92) (93) (94). A viselkedési vagy morfológiai eredmények mintázatait, ha vannak ilyenek, valamint a dózis-válaszra utaló bizonyítékokat meg kell vitatni. A fejlődési neurotoxicitás értékelése szempontjából lényeges valamennyi vizsgálatból származó adatokat bele kell foglalni kell ebbe a jellemzésbe, beleértve az emberi epidemiológiai vizsgálatokat vagy esettanulmányokat, illetve az állatkísérleteket (pl. toxikokinetikai adatok, szerkezet-hatás információk és egyéb toxicitási vizsgálatok adatai). Ez magában foglalja a vizsgált vegyi anyag dózisai és a neurotoxikus hatás jelenléte vagy hiánya, gyakorisága és mértéke (nemenként) közötti kapcsolatot (20) (95).

48. Az adatok értékelésének tartalmaznia kell a biológiai és a statisztikai szignifikancia diszkusszióját. A statisztikai elemzést olyan eszköznek kell tekinteni, amely inkább segíti, mintsem meghatározza az adatok értelmezését. Egyedül a statisztikai szignifikancia hiánya alapján nem lehet a kezeléssel összefüggő hatás hiányára vonatkozó következtetést levonni, és egyedül a statisztikai szignifikancia alapján nem lehet a kezeléssel összefüggő hatásra sem következtetni. Az esetleges hamis negatív eredmények és a „negatív tények bizonyításának” nehézségei elleni védekezés érdekében tárgyalni kell a rendelkezésre álló pozitív és történeti kontroll adatokat, különösen akkor, ha nem mutatkoztak kezeléssel összefüggő hatások (102) (106). A hamis pozitív eredmények valószínűségét az adatok teljes statisztikai értékelésének fényében kell tárgyalni (96). Az értékelésnek tartalmaznia kell a megfigyelt neuropatológiai és viselkedési változások közötti kapcsolatot, ha van ilyen.

49. Minden eredményt elemezni kell a kísérleti elrendezésnek megfelelő statisztikai modellekkel (108). A paraméteres és nem paraméteres elemzés közötti választást meg kell indokolni, figyelembe véve olyan tényezőket, mint például az adatok jellege (transzformált vagy nem), eloszlása, valamint a kiválasztott statisztikai elemzési módszer relatív robusztussága. A vizsgálat céljának és elrendezésének útmutatóul kell szolgálnia a statisztikai elemzési módszer kiválasztásakor, hogy minimalizálni lehessen az I-es típusú (hamis pozitív) és a II-es típusú (hamis negatív) hibákat (96) (97) (104) (105). Az egyszerre többet ellő fajokat használó fejlődési vizsgálatok esetében, ahol almonként több kölyköt vizsgálunk, a statisztikai modellnek az almot is tartalmaznia kell, hogy csökkenteni lehessen az I-es típusú hibák arányát (98) (99) (100) (101). Statisztikai mértékegységül az almot kell választani, nem a kölyköt. A kísérleteket úgy kell megtervezni, hogy az alomtársakat ne tekintsük önálló megfigyelésnek. Az ugyanabban az alanyban többször mért végpontot olyan statisztikai modellel kell elemezni, amely figyelembe veszi, hogy ezek nem független mérések.

Vizsgálati jegyzőkönyv

50. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— fizikai jelleg és szükség szerint a fizikai és kémiai tulajdonságok,

— azonosító adatok, beleértve a forrást is,

▼M5

— a készítmény tisztasága, az ismert és/vagy várható szennyeződések.

Vivőanyag (ha van):

— a vivőanyag kiválasztásának indokolása, ha az nem víz vagy fiziológiás sóoldat.

Kísérleti állatok:

— az alkalmazott faj és törzs, és a patkánytól eltérő faj választásának indokolása,

— a kísérleti állatok szállítója,

— az állatok száma, kora a vizsgálat kezdetekor, neme,

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány, víz stb.,

— az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetekor.

Vizsgálati körülmények:

— az adagolási szintek megválasztásának indokolása,

— az adagolási útvonal és időszak megválasztásának indokolása,

— a beadott dózisok, ezen belül a vivőanyagra, valamint a beadott anyag térfogatára és fizikai formájára vonatkozó adatok részletes leírása,

— a vizsgált vegyi anyag formulázásával/a takarmány előkészítésével, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenitásával kapcsolatos adatok,

— az anyaállatok és az utódok egyedi azonosítására használt módszer,

— azon randomizálási eljárás(ok) részletes leírása, amelye(ke)t az anyaállatok kezelési csoportokhoz való hozzárendelésére, a kölykök selejtezésre történő kiválasztására, valamint a kölykök tesztcsoportokhoz való hozzárendelésére felhasználtunk,

— a vizsgált vegyi anyag beadására vonatkozó adatok,

— ha alkalmazandó, a vizsgált vegyi anyag takarmányban/ivóvízben lévő koncentrációjának (ppm) átszámítása a tényleges dózisra (mg/testtömeg kg/nap),

— környezeti feltételek,

— a táplálék és a víz minősége (pl. csapvíz, desztillált víz),

— a vizsgálat kezdetének és végének napja.

Megfigyelések és vizsgálati eljárások:

— a megfigyelések és az eljárások szabványosítására használt eljárások, valamint a megfigyelések pontozására szolgáló operatív definíciók részletes leírása,

— az alkalmazott vizsgálati eljárások listája az alkalmazásuk indokolásával,

— az alkalmazott viselkedési/funkcionális, patológiai, neurokémiai és elektrofiziológiai eljárások részletei, beleértve az automatizált eszközökre vonatkozó információkat és adatokat is,

— az eszközök kalibrálását szolgáló és egyenértékűségüket biztosító, illetve a kezelési csoportoknak a vizsgálati eljárásokban való kiegyensúlyozását biztosító eljárások,

— minden, szakmai megítélést igénylő döntés rövid indokolása.

▼M5

Eredmények (egyenként és összefoglalóan, szükség szerint középértékek és szórásnégyzetek megadásával):

— az állatok száma a vizsgálat kezdetén és végén,

— az egyes vizsgálati módszerekhez felhasznált állatok és almok száma,

— az egyes állatok és származási almuk azonosító száma,

— az alomméret és az átlagos születéskori testtömeg nemenként,

— a testtömegre és a testtömeg változására vonatkozó adatok, beleértve az anyaállatoknak és az utódoknak a vizsgálat befejezésekor mért testtömegét is,

— takarmányfogyasztási és indokolt esetben vízfogyasztási adatok (például ha a vizsgált vegyi anyagot vízzel adtuk be),

— a toxikus reakciókra vonatkozó adatok nemek és adagolási szint szerint, beleértve a toxicitás jeleit vagy az elhullást, beleértve adott esetben az elhullás okát és időpontját is,

— a részletes klinikai megfigyelések jellege, súlyossága, időtartama, a fellépés napja, időpontja és lefolyása,

— a fejlődési tájékozódási pontok (testtömeg, szexuális érés és viselkedési egyedfejlődés) pontszámai az egyes megfigyelési időpontokban,

— a viselkedési, funkcionális, neuropatológiai, neurokémiai, elektrofiziológiai eredmények részletes leírása nemek szerint, beleértve a kontrollokhoz viszonyított növekedéseket és csökkenéseket is,

— boncolási eredmények,

— agytömegek,

— a neurológiai tünetekből és léziókból levezetett diagnózisok, beleértve a természetesen előforduló betegségeket vagy állapotokat is,

— a jellemzőnek tekintett leletekről készült képek,

— a morfometriára használt metszetek homológ voltának értékelésére szolgáló kis nagyítású képek,

— felszívódási és anyagcsereadatok, beleértve a külön toxikokinetikai vizsgálatból származó kiegészítő adatokat is, ha volt ilyen,

— az eredmények statisztikai feldolgozása, beleértve az adatok és az eredmények elemzésére használt statisztikai modelleket is, függetlenül attól, hogy szignifikánsak voltak-e vagy sem,

— a vizsgáló személyzet névjegyzéke, beleértve a szakmai képzéseket is.

Az eredmények diszkussziója:

— dózis-hatás információk nemenként és csoportonként,

— bármely más toxikus hatás és a vizsgált vegyi anyag neurotoxicitási potenciáljával kapcsolatban levont következtetések kapcsolata nemenként és csoportonként,

— a toxikokinetikai információk (ha vannak ilyenek) hatása a következtetésekre,

— hasonlóságok bármely ismert neurotoxikus anyag hatásaival,

▼M5

— a vizsgálati módszer megbízhatóságát és érzékenységét alátámasztó adatok (pozitív és történeti kontrolladatok),

— a neuropatológiai és a funkcionális hatások közötti kapcsolatok, ha vannak ilyenek,

— NOAEL- vagy benchmarkdózis az anyaállatok és az utódok esetében, nemenként és csoportonként.

Következtetések:

— az adatok értelmezésének átfogó diszkussziója az eredmények alapján, beleértve az arra vonatkozó következtetést, hogy a vizsgált vegyi anyag okozott-e fejlődési neurotoxicitást vagy sem, valamint a NOAEL-t is.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13-14 June 1995.

(2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].

(4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109:79-91.

(5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109:101-111.

(6) Garman, R.H., Fix,A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109:93-100.

(7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23-25 October 2000.

(8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008. Elektronikus formátumban: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage = en].

(9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Elektronikus formátumban: [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) E melléklet B.34. fejezete: Egygenerációs reprodukciós toxicitásvizsgálat.

(15) E melléklet B.35. fejezete: Kétgenerációs reprodukciós toxicitásvizsgálat.

(16) E melléklet B.43. fejezete: Neurotoxicitási vizsgálat rágcsálókban.

(17) E melléklet B.31. fejezete: Prenatális fejlődési toxicitásvizsgálat.

(18) Az Európai Parlament és a Tanács 2010. szeptember 22-i 2010/63/EU irányelve a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről, HL L 276., 2010.10.20., 33. o.

(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. Elektronikus formátumban: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

(20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches,* (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Elektronikus formátumban: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

(21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, *1st Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

(22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19:499-509.

(23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38:2-6.

(24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27:110-112.

(25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13:118-136.

(26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

(27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective.* Academic Press, Orlando.

(28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research. ILSI Press, Washington, DC.

(29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24:87-94.

(30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1-4.

(31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use.

(32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6:433-439.

▼**M5**

(33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20:449-457.

(34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13:383-390.

(35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58:350-365.

(36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579-586.

(37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17:298-303.

(38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12:489-95.

(39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23:896-920.

(40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology.* Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 67-100.

(41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1:53-66.

(42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pp. 37-82.

(43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117-129.

(44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247-260.

(45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599-609.

(46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405-411.

(47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals.Physiol. Behav., 64:661-669.

(48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589-591.

(49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pp. 287-351

(50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59:107-128.

(51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pp. 181-211.

▼**M5**

(52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8:199-211.

(53) Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res.,80:25-30.

(54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:437–445.

(55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pp. 125-145.

(56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321-332.

(57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev. 6:247-296.

(58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10:237-244.

(59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103:98-105.

(60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17:465-479.

(61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11:47-60.

(62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48:29-69.

(63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36:60-90.

(64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9:235-241.

(65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20:387-399.

(66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10:327-332.

(67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342-352.

(68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. J. Gerontol., 36:338–341.

(69) Fix, A.S, Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28: 122-131.

(70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84-107.

(71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

▼**M5**

(72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24: 291-304.

(73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874:123-130.

(74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53:365-372.

(75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16:545-561.

(76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:745-755.

(77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20:417-432.

(78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. Neurobehav. Toxicol., 1:129–135.

(79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy, Springer-Verlag, New York.

(80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57: 305-310.

(81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609: 262-268.

(82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26:707-710.

(83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22:51-61.

(84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130: 813–831.

(85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49:113-121.

(86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84:294-298.

(87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pp. 3-41.

(88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283:70-74.

▼M5

(89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287:1056–1060.

(90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.

(91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63:127-133.

(92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104:401-405.

(93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A.

(94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.

(95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

(96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5:113-126.

(97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 8:21-27.

(98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6:329-335.

(99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12:165-172.

(100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14: 221-228.

(101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:587-90.

(102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26:345-352.

(103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing – for today. Toxicol. Pathol. 34:296-313.

(104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3):205-210.

(105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41:295-301.

(106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266-287.

(107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology,* 30(4):288-325.

▼**M5**

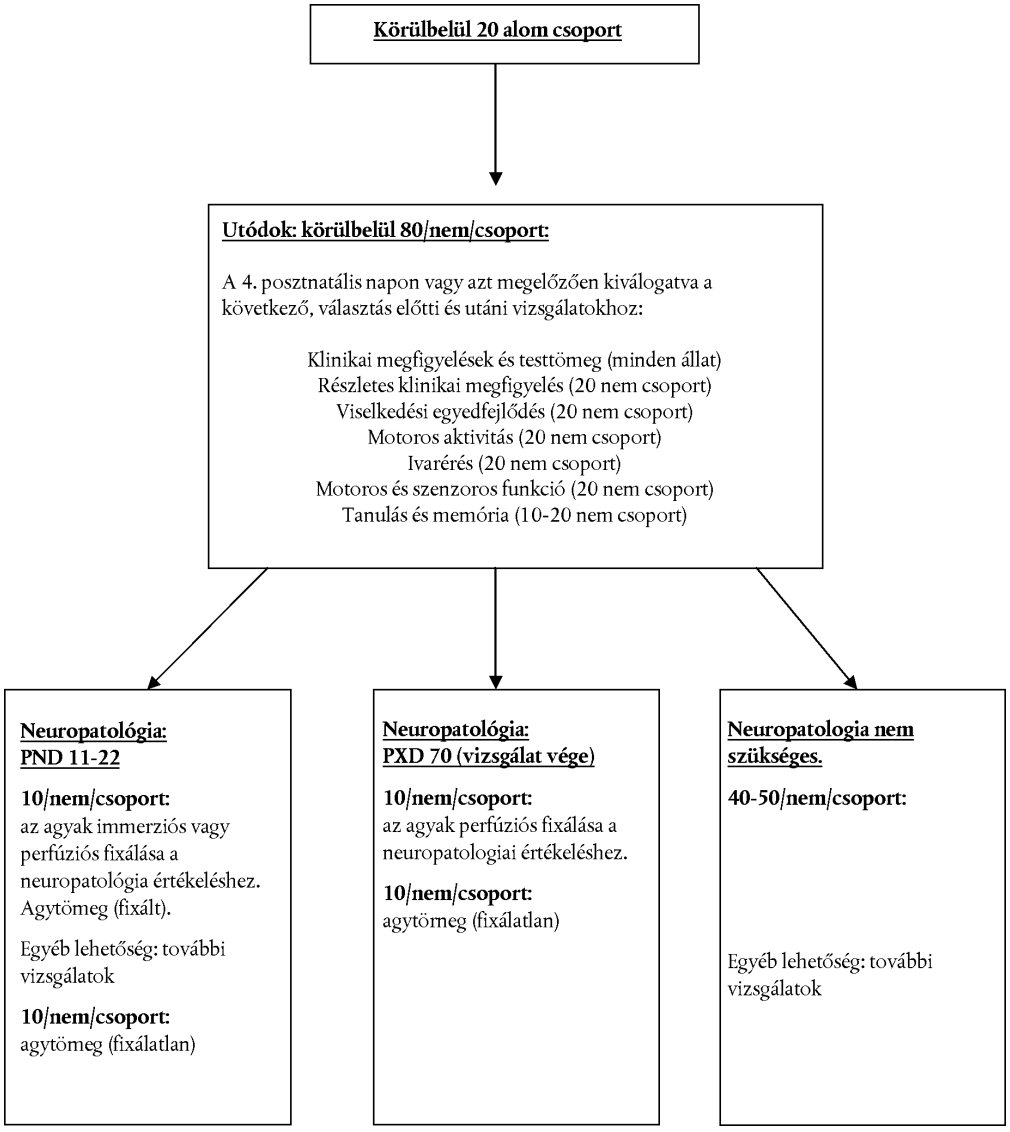
(108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326-348.

(109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349-381.

▼M5

1. ábra

Általános vizsgálati elrendezés a funkcionális/viselkedési tesztekhez, a neuropatológiai értékeléshez és az agytömegek vizsgálatához. Ez a vázlatrajz a 13–15. bekezdésben foglalt leíráson alapul (PND = posztnatális nap). Az állatok besorolására vonatkozó példák az 1. függelékben találhatók.



▼M5

1. függelék

1. A lehetséges besorolásokra vonatkozó példák bemutatása szöveges és táblázatos formában az alábbiakban található. Ezek a példák annak illusztrálására szolgálnak, hogy a vizsgálati állatok különböző tesztelési paradigmákba való besorolása több különböző módon is elvégezhető.

1. példa

2. Nemenként és dózisszintenként 20 kölyköt (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény kölyköt) használunk a viselkedési egyedfejlődés elválasztás előtti tesztelésére. Ezek közül az állatok közül nemenként és dózisszintenként 10 kölyköt (azaz almonként 1 hím vagy 1 nőstény kölyköt) a 22. posztnatális napon (PND 22) humánusan elpusztítunk. Az agyakat eltávolítjuk, lemérjük, és feldolgozzuk a szövettani értékeléshez. Ezen túlmenően agytömegadatokat gyűjtünk a dózisszintenként fennmaradó 10 hím és 10 nőstény állat fixálatlan agyának felhasználásával.

3. Nemenként és dózisszintenként további 20 állatot (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény kölyköt) használunk az elválasztás utáni funkcionális/viselkedési tesztek céljára (részletes klinikai vizsgálatok, motoros aktivitás, riasztó hanghatások és kognitív funkciók tesztelése serdülő állatokban) és a szexuális éréskori életkor értékelésére. Ezek közül az állatok közül nemenként és dózisszintenként 10 kölyköt (azaz almonként 1 hím vagy 1 nőstény kölyköt) a vizsgálat befejezésekor (kb. PND 70) elaltatunk és perfúzióval rögzítünk. További in situ fixálást követően az agyat eltávolítjuk, és feldolgozzuk a neuropatológiai értékeléshez.

4. A kognitív funkciók fiatal felnőtt egyedekben (pl. PND 60-70) történő vizsgálatához egy harmadik adag, nemenként és dózisszintenként 20 db (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény) kölyköt kell használni. Ezek közül az állatok közül nemenként és csoportonként 10 állatot (almonként 1 hím vagy 1 nőstény egyedet) a vizsgálat befejezésekor el kell pusztítani, az agyakat el kell távolítani, majd megmérni.

5. A maradék 20 állat/nem/csoport esetleges további vizsgálatok számára van fenntartva.

1. táblázat

Kölyök sorszáma ([a])		A vizsgálatba besorolt kölykök száma	Vizsgálat/Teszt
h	n		
1	5	20 h + 20 n	Viselkedési egyedfejlődés
		10 h + 10 n	PND 22 agytömeg/neuropatológia/morfometria
		10 h + 10 n	PND 22 agytömeg
2	6	20 h + 20 n	Részletes klinikai megfigyelések
		20 h + 20 n	Motoros aktivitás
		20 h + 20 n	Nemi érés
		20 h + 20 n	Motoros és szenzoros funkció
		20 h + 20 n	Tanulás és memória (PND 25)
		10 h + 10 n	Fiatal felnőtt agytömeg/neuropatológia/morfometria ~PND 70

▼M5

Kölyök sorszáma ([a])		A vizsgálatba besorolt kölykök száma	Vizsgálat/Teszt
h	n		
3	7	20 h + 20 n	Tanulás és memória (fiatal felnőtt egyedek)
		10 h + 10 n	Fiatal felnőtt agytömeg ~PND 70
4	8	—	Tartalék állatok pótlás vagy további tesztek céljára

([a]) Ebben a példában az almokat leredukáljuk 4 hím + 4 nőstény egyedre; a hím kölyköket 1-től 4-ig, nőstény kölyköket 5-től 8-ig számozzuk.

2. példa

6. Nemenként és dózisszintenként 20 kölyköt (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény) használunk a viselkedési egyedfejlődés elválasztás előtti tesztelésére. Ezek közül az állatok közül nemenként és dózisszintenként 10 kölyköt (almonként 1 hím vagy 1 nőstény kölyköt) humánusan elpusztítunk a 11. posztnatális napon (PND 11). Az agyakat eltávolítjuk, lemérjük, és feldolgozzuk a szövettani értékeléshez.

7. Nemenként és dózisszintenként további 20 állatot (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény kölyköt) használunk az elválasztás utáni vizsgálatok céljára (részletes klinikai megfigyelések, motoros aktivitás, a szexuális éréskori életkor értékelése, motoros és szenzoros funkció). Ezek közül az állatok közül nemenként és dózisszintenként 10 kölyköt (azaz almonként 1 hím vagy 1 nőstény kölyköt) a vizsgálat befejezésekor (kb. PND 70) elaltatunk és perfúzióval rögzítünk. További in situ fixálást követően az agyat eltávolítjuk, megmérjük, és feldolgozzuk a neuropatológiai értékeléshez.

8. A kognitív funkciók serdülő és fiatal felnőtt egyedekben történő vizsgálatához nemenként és dózisszintenként 10 db kölyköt használunk (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény kölyköt). Különböző állatokat használunk a kognitív funkció vizsgálatához a 23. posztnatális napon (PND 23) és fiatal felnőttekben. A vizsgálat befejezésekor a felnőttkorban vizsgálandó nemenkénti és csoportonkénti 10 állatot elpusztítjuk, majd az agyakat eltávolítjuk és megmérjük.

9. A vizsgálatra ki nem választott maradék 20 db/nem/csoport állatot az elválasztáskor elpusztítjuk és eltávolítjuk.

2. táblázat

Kölyök sorszáma ([a])		A vizsgálatba besorolt kölykök száma	Vizsgálat/Teszt
h	n		
1	5	20 h + 20 n	Viselkedési egyedfejlődés
		10 h + 10 n	PND 11 agytömeg/neuropatológia/morfometria
2	6	20 h + 20 n	Részletes klinikai megfigyelések
		20 h + 20 n	Motoros aktivitás
		20 h + 20 n	Nemi érés
		20 h + 20 n	Motoros és szenzoros funkció
		10 h + 10 n	Fiatal felnőtt agytömeg/neuropatológia/morfometria ~PND 70

▼M5

Kölyök sorszáma ([a])		A vizsgálatba besorolt kölykök száma	Vizsgálat/Teszt
h	n		
3	7	10 h + 10 n ([b])	Tanulás és memória (PND 23)
3	7	10 h + 10 n ([b])	Tanulás és memória (fiatal felnőtt egyedek) Fiatal felnőtt agytömeg
4	8	—	Az állatokat a 21. posztnatális napon (PND 21) elpusztítjuk és eltávolítjuk.

([a]) Ebben a példában az almokat leredukáljuk 4 hím + 4 nőstény egyedre; a hím kölyköket 1-től 4-ig, nőstény kölyköket 5-től 8-ig számozzuk meg.

([b]) Különböző kölyköket használunk a kognitív funkció vizsgálatához a 23. posztnatális napon (PND 23) és fiatal felnőttekben (pl. páros/páratlan alom az összesen 20 alomból).

3. példa

10. Nemenként és dózisszintenként 20 kölyköt (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény kölyköt) használunk a 11. posztnatális napon (PND 11) az agytömeg mérésére és a neuropatológiai értékelésre. Ezek közül az állatok közül nemenként és dózisszintenként 10 kölyköt (azaz almonként 1 hím vagy 1 nőstény kölyköt) a 11. posztnatális napon (PND 11) humánusan elpusztítunk, majd az agyakat eltávolítjuk, lemérjük és feldolgozzuk a kórszövettani értékeléshez. Ezen túlmenően agytömeg-adatokat gyűjtünk a dózisszintenként fennmaradó 10 hím és 10 nőstény állat fixálatlan agyának felhasználásával.

11. Nemenként és dózisszintenként további 20 állatot (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény kölyköt) használunk a viselkedési egyedfejlődés (motoros aktivitás) értékelésére, illetve az elválasztás utáni vizsgálatok céljára (motoros aktivitás, a szexuális éréskori életkor értékelése), valamint a serdülőkori kognitív funkció tesztelésére.

12. Nemenként és dózisszintenként további 20 állatot (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény kölyköt) használunk a motoros és szenzoros funkciós tesztek (riasztó hanghatások) és a részletes klinikai megfigyelések céljára. Ezek közül az állatok közül nemenként és dózisszintenként 10 kölyköt (azaz almonként 1 hím vagy 1 nőstény kölyköt) a vizsgálat befejezésekor (kb. PND 70) elaltatunk és perfúzióval rögzítünk. További in situ fixálást követően az agyat eltávolítjuk, megmérjük, és feldolgozzuk a neuropatológiai értékeléshez.

13. Nemenként és dózisszintenként további 20 állatot (azaz almonként 1 hím és 1 nőstény kölyköt) használunk a fiatal felnőtt egyedek kognitív funkciójának tesztelésére. Ezek közül az állatok közül nemenként és csoportonként 10 állatot (azaz almonként 1 hím vagy 1 nőstény egyedet) a vizsgálat befejezésekor elpusztítunk, az agyakat eltávolítjuk, majd megmérjük.

3. táblázat

Kölyök sorszáma ([a])		A vizsgálatba besorolt kölykök száma	Vizsgálat/Teszt
h	n		
1	5	10 h + 10 n	PND 11 agytömeg/neuropatológia/morfometria
		10 h + 10 n	PND 11 agytömeg
2	6	20 h + 20 n	Viselkedési egyedfejlődés (motoros aktivitás)
		20 h + 20 n	Motoros aktivitás
		20 h + 20 n	Nemi érés
		20 h + 20 n	Tanulás és memória (PND 27)

▼**M5**

Kölyök sorszáma ([a])		A vizsgálatba besorolt kölykök száma	Vizsgálat/Teszt
h	n		
3	7	20 h + 20 n	Riasztó hanghatások (serdülők és fiatal felnőtt egyedek)
		20 h + 20 n	Részletes klinikai megfigyelések
		10 h + 10 n	Fiatal felnőtt agytömeg/neuropatológia/morfometria ~PND 70
4	8	20 h + 20 n	Tanulás és memória (fiatal felnőtt egyedek)
		10 h + 10 n	Fiatal felnőtt agytömeg

([a]) Ebben a példában az almokat leredukáljuk 4 hím + 4 nőstény egyedre; a hím kölyköket 1-től 4-ig, nőstény kölyköket 5-től 8-ig számozzuk.

▼**M5**

2. függelék

Fogalommeghatározások

Vegyi anyag: egy anyag vagy keverék

Vizsgált vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

▼M5

B.54. UTEROTROFIKUS BIOLÓGIAI VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKBAN: GYORS SZŰRŐVIZSGÁLAT AZ ÖSZTROGÉNSZERŰ TULAJDONSÁGOK KIMUTATÁSÁRA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 440. vizsgálati iránymutatásában (2007) leírt módszerrel. Az OECD 1998-ban a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint az endokrin rendszert esetlegesen károsító anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó új vizsgálati iránymutatások kidolgozására irányuló, kiemelt fontosságú tevékenységet indított (1). A tevékenység egyik eleme a rágcsáló uterotrofikus biológiai vizsgálati iránymutatásának kidolgozása volt. A rágcsáló uterotrofikus biológiai vizsgálatát ezután egy alapos validálási programnak vetették alá, beleértve a részletes háttér-dokumentáció összeállítását (2) (3), valamint a kiterjedt laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti vizsgálatokat, amelyek a biológiai vizsgálat relevanciáját és reprodukálhatóságát vizsgálták erős referencia-ösztrogénnel, gyenge ösztrogén-receptor agonistákkal, erős ösztrogén-receptor antagonistával, illetve negatív referencia vegyi anyaggal (4) (5) (6) (7) (8) (9). A B.54 vizsgálati módszer a validálási tesztprogram során szerzett tapasztalatokon és az ösztrogén agonistákkal kapcsolatban ennek keretében gyűjtött eredményeken alapul.

2. Az uterotrofikus biológiai vizsgálat egy gyors szűrővizsgálat, amelyet eredetileg az 1930-as években fejlesztettek ki (27) (28), és elsőként egy szakértői bizottság szabványosította szűrés céljára 1962-ben (32) (35). A vizsgálat a méh tömegének növekedésén vagy az uterotrofikus válasz fokozódásán alapul (összefoglalásért lásd: 29). Abból a szempontból értékeli a vegyi anyagokat, hogy képesek-e a természetes ösztrogének (például 17ß-ösztradiol) agonistáiéhoz vagy antagonistáiéhoz hasonló biológiai aktivitást kiváltani, habár sokkal ritkábban használják antagonisták, mint agonisták kimutatására. A méh kétféle módon reagál az ösztrogénre. A kezdeti válasz részben a megnövekedett vízfelvétel miatti tömeggyarapodás. Ezt a választ a szöveti osztódás miatti tömeggyarapodás követi (30). A méh által adott válaszok a patkányokban és az egerekben minőségileg hasonlóak.

3. Ez a biológiai vizsgálat in vivo szűrővizsgálati célokat szolgál, és alkalmazását az „OECD fogalmi kerete az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok tesztelésére és értékelésére” (2. függelék) összefüggésében kell szemlélni. Ebben a fogalmi keretben a uterotrofikus biológiai vizsgálatot a 3. szint tartalmazza olyan *in vivo* vizsgálatként, amely egyetlen endokrin mechanizmusról, az ösztrogénszerű hatásról szolgáltat adatokat.

4. A uterotrofikus biológiai vizsgálatot arra használják, hogy beépítik az endokrin rendszerrel potenciálisan kölcsönhatásba lépő vegyi anyagok azonosítására szolgáló *in vitro* és *in vivo* vizsgálatsorozatba, amely végső soron az emberi egészségre vagy a környezetre gyakorolt kockázatok értékelését célozza. Az OECD validálási program erős és gyenge ösztrogén agonistákat egyaránt használt a vizsgálat ösztrogénszerű aktivitással rendelkező vegyszerek azonosítása terén nyújtott teljesítményének értékelésére (4) (5) (6) (7) (8). Ezáltal a vizsgálati eljárás érzékenysége az ösztrogén agonisták tekintetében jól bizonyított, jó laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság mellett.

5. Ami a negatív vegyi anyagokat illeti, csak egyetlen „negatív” referencia vegyi anyag szerepelt a validálási programban, amelyet már negatívnak talált úgy az uterotrofikus vizsgálat, mint az *in vitro* receptorkötési és receptorvizsgálatok, de további, az OECD validálási programmal összefüggésben nem álló vizsgálati adatokat is kiértékeltek, hogy még jobban alátámasszák az uterotrofikus biológiai vizsgálat ösztrogén agonisták szűrése terén mutatott specificitását (16).

▼M5

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

6. Az ösztrogén agonisták és antagonisták ligandumként hatnak az a és b ösztrogén receptorokra és aktiválhatják vagy gátolhatják a receptorok transzkripciós működését. Ez káros egészségügyi kockázatokat eredményezhet, beleértve a reproduktív és a fejlődési hatásokat. Ezért fennáll az igény a vegyi anyagok lehetséges ösztrogén agonista vagy antagonista hatásának gyors felmérésére és értékelésére. Bár informatív, a ligandum affinitása egy ösztrogén receptorhoz vagy a riporter gének *in vitro* transzkripciós aktiválása csak egy a lehetséges veszélyt meghatározó számos tényező közül. További tényezők lehetnek a szervezetbe történő belépéskor bekövetkező metabolikus aktiválódás és deaktiválódás, a célszövetekbe történő disztribúció, illetve a szervezetből történő kiürülés, amelyek legalább részben a beadás módjától és a vizsgált vegyi anyagtól függenek. Ennek következtében szükség van arra, hogy *in vivo*, azaz aktuális körülmények között szűrjék a vegyi anyagok lehetséges aktivitását, kivéve, ha a vegyi anyag jellemzői a felszívódás-eloszlás-metabolizmus-kiürülés (absorption-distribution-metabolism-elimination, ADME) tekintetében már jelenleg is megfelelő információkat szolgáltatnak. A méh szövetei gyors és erőteljes növekedéssel reagálnak az ösztrogének általi stimulációra, különösen laboratóriumi rágcsálókban, ahol az ösztrogénciklus körülbelül 4 napig tart. A rágcsálófajokat, különösen a patkányokat, széles körben használják a kockázatok jellemzését célzó toxicitási vizsgálatokra is. Ezért a rágcsálók méhe megfelelő célszerv az ösztrogén agonisták és antagonisták *in vivo* szűrésére.

7. A vizsgálati módszer az OECD validálási vizsgálatban alkalmazott azon protokollokon alapul, amelyeket a laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti vizsgálatokban megbízhatónak és megismételhetőnek találtak (5) (7). Jelenleg két módszer, nevezetesen az ovariektomizált kifejlett nőstény módszer (ovx-felnőtt módszer), és az éretlen, nem ovariektomizált módszer (éretlen módszer) áll rendelkezésre. Az OECD validálási tesztprogramban bebizonyosodott, hogy a két módszer összehasonlítható érzékenységgel és reprodukálhatósággal rendelkezik. Az éretlen módszer azonban, mivel az állatok érintetlen hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) tengellyel rendelkeznek, valamivel kevésbé specifikus, viszont a benne foglalt vizsgálatok köre nagyobb, mint az ovariektomizált módszer esetében, mert reagálni képes azokra a vegyi anyagokra is, amelyek nemcsak az ösztrogén receptorral, hanem a HPG-tengellyel is kölcsönhatásba lépnek. A patkány HPG-tengelye körülbelül 15 napos korban kezd működni. Ezt megelőzően a pubertást nem lehet olyan kezelésekkel felgyorsítani, mint pl. a GnRH. Amikor a nőstények kezdik elérni a pubertáskort, a nőstényeknek a hüvelykinyílás előtt több csendes ciklusuk van, amelyek nem eredményeznek hüvelykinyílást vagy ovulációt, de hormonális ingadozások megfigyelhetők. Ha egy vegyi anyag közvetlenül vagy közvetve serkenti a HPG-tengelyt, az korai pubertást, korai ovulációt és gyorsított hüvelykinyílást eredményez. Nemcsak a HPG tengelyre ható vegyi anyagok képesek erre, hanem néhány magasabb metabolizálható energiaszintet tartalmazó étrend is, amelyek serkentik a növekedést és felgyorsítják a hüvelykinyílást, anélkül, hogy ösztrogénszerű hatásuk lenne. Az ilyen vegyi anyagok nem váltanak ki uterotrofikus választ az OVX felnőtt állatokban, mivel a HPG-tengelyük nem működik.

8. Állatjóléti okok miatt az éretlen patkányokat használó módszert kell előnyben részesíteni, elkerülve az állatok műtéti előkezelését és elkerülve azoknak az állatoknak a kihagyását, amelyek kezdődő ivarzásra utaló bármilyen jelet mutatnak (lásd 30. bekezdés).

▼M5

9. Az uterotrofikus válasz nem teljesen ösztrogén eredetű, azaz az ösztrogén agonistákon vagy antagonistákon kívül egyéb vegyi anyagok is választ válthatnak ki. Például a progeszteron, a tesztoszteron, vagy a különféle szintetikus progesztinek viszonylag nagy dózisai mind stimulációhoz vezethetnek (30). Bármilyen választ szövettanilag lehet elemezni a keratinizáció és a hüvely-elszarusodás jelenlétére (30). A válasz lehetséges eredetétől függetlenül az uterotrofikus biológiai vizsgálat pozitív eredménye alapján további tisztázást célzó intézkedéseket kell kezdeményezni. Az ösztrogénszerű hatásra vonatkozó további bizonyítékokat lehet gyűjteni az *in vitro* vizsgálatokból, úgymint az ER kötődési vizsgálatokból és transzkripciós aktiválási vizsgálatokból, illetve más *in vivo* vizsgálatokból, úgymint a nőstény pubertás vizsgálatból.

10. Figyelembe véve, hogy az uterotrofikus biológiai vizsgálat *in vivo* szűrővizsgálatként szolgál, a kiválasztott validálási megközelítés egyaránt megfelelt az állatjólléti megfontolásoknak és a lépcsőzetes vizsgálati stratégiának. Ezért az erőfeszítések arra összpontosultak, hogy alaposan validálják az ösztrogénszerű hatás – amely a fő aggály számos vegyi anyaggal szemben – reprodukálhatóságát és érzékenységét, míg a vizsgálat antiösztrogén elemére kevesebb figyelem irányult. Csak egyetlen erős aktivitású antiösztrogént vizsgáltak, mivel az egyértelmű antiösztrogén-profillal (amelyet nem fed el valamilyen ösztrogénszerű aktivitás) rendelkező vegyi anyagok száma nagyon korlátozott. Így ez a vizsgálati módszer az ösztrogén protokollhoz tartozik, míg a vizsgálat antagonista módozatát leíró protokollt az iránymutatás tartalmazza (37). A tisztán antiösztrogén aktivitású vegyi anyagok esetében a vizsgálat reprodukálhatóságát és érzékenységét később fogják pontosabban meghatározni, miután a vizsgálati eljárást már egy ideig rutinszerűen használták, és több ilyen aktivitással rendelkező vegyi anyagot beazonosítottak.

11. Minden állatkísérleteken alapuló eljárást az állatgondozásra vonatkozó helyi szabványoknak megfelelően kell végrehajtani; az alábbiakban foglalt, gondozásra és kezelésre vonatkozó leírások minimális teljesítményszabványok, amelyeket a helyi szabályozások – mint például a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63/EU európai parlamenti és tanácsi irányelv (2010. szeptember 22.) (38) – felülírnak (38). Az állatokkal való humánus bánásmódról további iránymutatás a megfelelő OECD-kiadványban található (25).

12. Mint minden, élő állatok felhasználásával végzett vizsgálat esetében, már a vizsgálat megkezdése előtt alapvető fontosságú ellenőrizni, hogy az adatok valóban szükségesek-e. Két olyan körülmény, amikor például az adatokra szükség lehet:

— magas expozíciós potenciál (az elvi keretrendszer 1-es szintje, 2. függelék) vagy ösztrogénszerű hatásra utaló jelek (2. szint) esetén annak vizsgálata, hogy az ilyen hatások *in vivo* is előfordulhatnak-e,

— a 4. vagy 5. szintű *in vivo* tesztekben mutatott ösztrogénszerű hatásra utaló jelek esetén annak alátámasztása, hogy a hatás kapcsolatban áll egy olyan ösztrogén-mechanizmussal, amelyet nem lehet *in vitro* vizsgálattal tisztázni.

13. Az ebben a vizsgálati módszerben használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

▼M5

A VIZSGÁLAT ELVE

14. Az uterotrofikus biológiai vizsgálat az érzékenység tekintetében egy állatkísérletekből álló rendszerre támaszkodik, amelyben a hipotalamusz-hipofízis-petefészek tengely nem működik, ami a keringő ösztrogén alacsony endogén szintjét eredményezi. Ez alacsony kiindulási méhtömeget és maximális választartományt biztosít a beadott ösztrogénre. Két ösztrogénre érzékeny állapot felel meg ennek a követelménynek nőstény rágcsálókban:

i. éretlen nőstények az elválasztás után és a pubertás előtt; és

ii. fiatal kifejlett nőstények a petefészek eltávolítása után, megfelelő időt adva a méhszövetek visszafejlődésére.

15. A vizsgált anyagot orális szondán keresztül vagy szubkután injekció formájában naponta adagoljuk. A vizsgált vegyi anyag fokozatos dózisait adjuk be a kísérleti állatok legalább két kezelési csoportjának (iránymutatásért lásd a 33. bekezdést), csoportonként egy dózisszintet használva, az anyagot az éretlen módszer esetében három egymást követő napon, az ovx felnőtt módszer esetében pedig minimálisan három egymást követő napon beadva. Az állatokat körülbelül 24 órával az utolsó dózis után felboncoljuk. Ösztrogén agonisták esetében a kezelt állatcsoport átlagos méhtömegét a vivőanyag-csoporthoz viszonyítva értékeljük a statisztikailag szignifikáns növekedés kimutatása érdekében. A vizsgálati csoport átlagos méhtömegének statisztikailag szignifikáns növekedése pozitív választ jelent a biológiai vizsgálatban.

A MÓDSZER ISMERTETÉSE

Az állatfaj kiválasztása

16. Általánosan használt laboratóriumi rágcsálótörzseket lehet alkalmazni. A validálás során például Sprague-Dawley- és Wistar-patkánytörzseket használtak. Az ismert vagy feltételezett alacsonyabb érzékenységű méhvel rendelkező törzseket nem szabad használni. A laboratóriumnak a 26. és 27. bekezdésben leírtak szerint bizonyítania kell a felhasznált törzs érzékenységét.

17. A patkányt és az egeret már az 1930-as évek óta használják rutinszerűen az uterotrofikus biológiai vizsgálatban. Az OECD validálási vizsgálatokat csak patkányokon végezték el azon az alapon, hogy a két fajt egyenértékűnek tekintették, ezért egy fajnak elegendőnek kell lennie a világméretű validálás céljára, hogy erőforrásokat és állatokat lehessen megtakarítani. A patkány a választott faj a legtöbb reprodukciós és fejlődési toxicitási vizsgálat esetében. Figyelembe véve, hogy hatalmas történelmi adatbázis létezik egerekre, egy korlátozott nyomonkövetésű validálási vizsgálatot végeztek egereken is annak érdekében, hogy az uterotrofikus biológiai vizsgálati módszert kiterjesszék az egerek kísérleti fajként való használatára (16). Egy áthidaló megközelítést választottak korlátozott számú vizsgált vegyi anyaggal, részt vevő laboratóriummal és nem kódolt minták vizsgálatával, összhangban az erőforrások és állatok megtakarítását célzó eredeti szándékkal. Az uterotrofikus biológiai vizsgálat fiatal felnőtt ovariektomizált egerekben végzett áthidaló validálási vizsgálata azt mutatja, hogy a patkányokban és egerekben kapott adatok minőségi és mennyiségi szempontból jól megfelelnek egymásnak. Ha az uterotrofikus biológiai vizsgálat eredménye egy hosszú távú vizsgálat előzménye, akkor mindkét kísérlethez ugyanabból a törzsből való, azonos eredetű állatokat használhatnak. Az áthidaló megközelítés az OVX egerekre korlátozódott és a jelentés nem nyújt megbízható adatsort az éretlen modell validálásához, ezért az egerek éretlen modelljét nem veszik figyelembe a jelenlegi vizsgálati módszer alkalmazási területén.

▼M5

18. Így bizonyos esetekben patkányok helyett egereket is lehet használni. Ennek fajnak a használatát toxikológiai, farmakokinetikai és/vagy egyéb kritériumokkal meg kell indokolni. Egerekben szükség lehet a protokoll módosítására. Például az egerek testtömeghez viszonyított takarmányfogyasztása nagyobb, mint a patkányoké, ezért a takarmány fitoösztrogén-tartalmának alacsonyabbnak kell lennie egerek, mint patkányok esetében (9) (20) (22).

Tartási és etetési körülmények

19. Minden eljárásnak meg kell felelnie a laboratóriumi állatgondozásra vonatkozó helyi szabványoknak. Ezek a gondozásra és kezelésre vonatkozó leírások minimális teljesítményszabványok, amelyeket a helyi szabályozások – mint például a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63/EU európai parlamenti és tanácsi irányelv (2010. szeptember 22.) (38) – felülírnak (38). A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérséklete 22 °C (kb. ±3 °C eltérési tartománnyal) kell, hogy legyen. A helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie és a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot. A relatív páratartalom célértékének 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges. Naponta 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást.

20. A laboratóriumi takarmányt és az ivóvizet korlátozás nélkül kell biztosítani. A fiatal felnőtt állatok egyedileg vagy legfeljebb három egyedből álló csoportokban is tarthatók. Az éretlen állatok fiatal kora miatt társas, csoportos tartás ajánlott.

21. A laboratóriumi takarmányok magas fitoösztrogén-tartalmáról már ismert, hogy olyan mértékben növeli meg a rágcsálók méhének tömegét, amely már zavarja az uterotrofikus biológiai vizsgálatot (13) (14) (15). A laboratóriumi takarmányok magas fitoösztrogén- és metabolizálható energia tartalma korai pubertáshoz is vezethet, ha éretlen állatokat használnak. A fitoösztrogének jelenléte elsősorban a szója és lucerna laboratóriumi takarmányba való beépítésének eredménye és a fitoösztrogének koncentrációja a standard laboratóriumi takarmány egyes gyártási tételei között is változik (23). A testtömeg egy fontos változó, mivel az elfogyasztott takarmány mennyisége összefügg a testtömeggel. Ezért az ugyanabból a takarmányból ténylegesen felvett fitoösztrogén-dózis állatfaj és életkor szerint különbözhet (9). Az éretlen nőstény patkányok testtömeg alapján számított takarmányfogyasztása mintegy kétszerese lehet az ovariektomizált fiatal felnőtt nőstényekének. A fiatal felnőtt egerek testtömeg alapján számított takarmányfogyasztása mintegy négyszerese lehet az ovariektomizált fiatal felnőtt nőstény patkányokénak.

22. Az uterotrofikus biológiai vizsgálat eredményei (9) (17) (18) (19) azonban azt mutatják, hogy korlátozott mennyiségű étrendi fitoösztrogén elfogadható és nem csökkenti a biológiai vizsgálat érzékenységét. Iránymutatásként, a fitoösztrogének étrendi szintje nem haladhatja meg a 350 μg genistein ekvivalens/gramm laboratóriumi takarmány értéket éretlen nőstény Sprague-Dawley- és Wistar-patkányok esetében (6) (9). Az ilyen étrend is megfelelő a fiatal felnőtt ovariektomizált patkányok vizsgálatkor, mivel a testtömegre vetített takarmányfogyasztás kisebb a fiatal felnőtt, mint a kifejlett állatokban. Amennyiben kifejlett ovariektomizált egereket vagy fitoösztrogénekre érzékenyebb patkányokat kell használni, oda kell figyelni az étrendi fitoösztrogénszint arányos csökkentésére (20). Ezen túlmenően, a különféle étrendek elérhető metabolikus energiájában mutatkozó különbségek a pubertás időpontjának eltolódásához vezethetnek (21) (22).

▼M5

23. A vizsgálat előtt gondosan ki kell választani egy olyan étrendet, amelynek nem magas a fitoösztrogén- vagy metabolizálható energiaszintje (útmutatásért lásd (6) (9)), amelyek zavarhatnák az eredményeket (15) (17) (19) (22) (36). A laboratórium által használt vizsgálati rendszer 26. és 27. bekezdésekben meghatározott megfelelő teljesítményének biztosítása érdekében mindkét tényezőt ellenőrizni kell. A helyes laboratóriumi gyakorlattal (GLP) összhangban lévő biztonsági intézkedésként reprezentatív mintavételt kell végezni a vizsgálat során alkalmazott takarmány minden egyes tételéből a takarmány fitoösztrogén-tartalmának esetleges analízise céljából (pl. ha a kontroll méhtömeg magas a történelmi kontrollokhoz viszonyítva, vagy ha a referencia ösztrogén, a 17-alfa-etinil-ösztradiol nem eredményez megfelelő választ). Az aliquotokat a vizsgálat részeként, vagy – 20°C-on fagyasztva, vagy olyan módon kell analizálni, amely megakadályozza a minták analízis előtti lebomlását.

24. Egyes alomanyagok természetes ösztrogén vagy antiösztrogén hatású vegyi anyagokat tartalmazhatnak (pl. a kukoricacsutkáról közismert, hogy befolyásolja a patkányok ciklusát és antiösztrogén hatású). A kiválasztott alomanyagnak minimális mennyiségű fitoösztrogént szabad tartalmaznia.

Az állatok előkészítése

25. A betegségekre vagy fizikai rendellenességekre utaló jeleket nem mutató kísérleti állatokat véletlenszerűen kell besorolni a kontroll- és a kezelési csoportokba. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezésének lehetséges hatásait. Az állatokat egyedi azonosítóval kell ellátni. Előnyös, ha az éretlen állatokat az akklimatizáció alatt az elválasztásig az anyaállatokkal vagy nevelőanyákkal közös ketrecekben helyezik el. Az akklimatizációs időszak a vizsgálat kezdete előtt fiatal felnőtt állatok és anyaállatokkal vagy nevelőanyákkal együtt szállított éretlen állatok esetében körülbelül 5 nap. Ha az éretlen állatokat választott állatokként, anyaállatok nélkül kapja meg a laboratórium, rövidebb időtartamú akklimatizációs időszak válhat szükségessé, mivel az adagolást az elválasztás után azonnal meg kell kezdeni (lásd a 29. bekezdést).

ELJÁRÁS

A laboratórium jártasságának igazolása

26. A laboratórium jártasságának ellenőrzésére két különböző módszert lehet alkalmazni:

— időszakos ellenőrzés, a kiindulási pozitív kontrollvizsgálatra támaszkodva (lásd a 27. bekezdést). Legalább hathavonta és minden alkalommal, amikor olyan változás történik, amely befolyásolhatja a vizsgálat teljesítményét (pl. új összetételű takarmány, változás a boncolást végző személyzetben, változás az állattörzsben vagy a szállítóban, stb.), ellenőrizni kell a tesztrendszer (állatmodell) érzékenységét a referencia ösztrogén megfelelő dózisának (a 27. bekezdésben leírt kiindulási pozitív kontrollvizsgálat alapján) használatával: 17a-etinil-ösztradiol (CAS-szám: 57-63-6) (EE),

— egyidejű ellenőrzések használata, melynek keretében minden vizsgálatba bevonnak egy csoportot, amelyet a referencia ösztrogén megfelelő adagjával kezelnek.

Ha a rendszer nem a várt választ adja, meg kell vizsgálni és megfelelően módosítani kell a kísérleti körülményeket. Ajánlatos, hogy a referencia ösztrogén alkalmazott dózisa mindkét megközelítés esetében megközelítőleg az ED70 és 80 között legyen.

▼M5

27. **Kiindulási pozitív kontrollvizsgálat** – Mielőtt a laboratórium első alkalommal végezne vizsgálatot eszerint a vizsgálati módszer szerint, a laboratóriumi jártasságát az állatmodell érzékenységének tesztelése útján igazolni kell a referencia ösztrogén dózis-válasz összefüggésének meghatározásával: 17a-etinil-ösztradiol (CAS-szám: 57-63-6) (EE), minimum négy dózisban. A méhtömeg-választ össze kell hasonlítani a megalapozott történeti adatokkal (lásd az (5) referenciát). Ha ez a kiindulási pozitív kontrollvizsgálat nem adja a várt eredményeket, a kísérleti körülményeket meg kell vizsgálni és módosítani kell.

Az állatok száma és állapota

28. Minden egyes kezelési és kontrollcsoportnak legalább 6 állatot kell tartalmaznia (mind az éretlen, mind az ovx felnőtt módszer protokollja esetében).

Az éretlen állatok életkora

29. Az éretlen állatokkal végzett uterotrofikus biológiai vizsgálat esetében meg kell adni a születés napját. Az adagolást elég korán kell kezdeni ahhoz, hogy a vizsgált vegyi anyag adagolásának végéig az endogén ösztrogének szintjének a pubertáshoz kapcsolódó fiziológiás megemelkedésére még ne kerüljön sor. Másrészt, bizonyíték van arra, hogy a nagyon fiatal állatok kevésbé érzékenyek lehetnek. Az optimális életkor meghatározása során minden laboratóriumnak a nemi éréssel kapcsolatos saját háttéradatait kell figyelembe vennie.

Általános szabályként alkalmazható, hogy patkányokban az adagolás a 18. posztnatális napon végrehajtott korai elválasztás után azonnal megkezdődhet (a születés napja a 0. posztnatális nap). Az adagolást patkányokban lehetőség szerint a 21. posztnatális napon be kell fejezni, de a 25. posztnatális napot megelőzően mindenféleképpen, mert ez után az életkor után a hipotalamusz-hipofízis-petefészek tengely működni kezd, és az endogén ösztrogén szintek emelkedni kezdhetnek, amivel együtt a kiindulási átlagos méhtömeg és a csoporton belüli szórás is megemelkedik (2) (3) (10) (11) (12).

Az ovariektómiára vonatkozó eljárás

30. Az ovariektomizált nőstény patkányok és egerek esetében (kezelési és kontrollcsoportok) a petefészek eltávolítására 6 és 8 hetes kor között kell sort keríteni. Patkányok esetében legalább 14 napnak kell eltelnie a petefészek eltávolítása és az adagolás első napja között, hogy a méh visszafejlődhessen egy minimális, stabil kiindulási állapotra. Egerek esetében legalább 7 napnak kell eltelnie a petefészkek eltávolítása és az adagolás első napja között. Mivel kis mennyiségű petefészek-szövet is elegendő egy szignifikáns keringő ösztrogénszint előállításához (3), az állatokat a felhasználás előtt meg kell vizsgálni a hüvelyből legalább öt egymást követő napon tamponált hámsejtek megfigyelésével (pl. patkányok esetében 10–14 nappal a petefészek eltávolítása után). Ha az állatok az oestrus bármilyen jelét mutatják, azokat az állatokat nem szabad használni. Továbbá, a petefészek-csonkokat boncoláskor meg kell vizsgálni a petefészek-szövet jelenlétére utaló bizonyítékokra. Amennyiben van ilyen, akkor az állatot nem kell használni a számításokban (3).

31. Az ovariektómia eljárása azzal kezdődik, hogy az állat a megfelelő altatást követően ventrális helyzetben fekszik. A dorzolaterális hasfalat megnyitó kb. 1 cm-es hosszanti bemetszést az alsó bordaszél és a csípőlapát közötti felezőpontban, az ágyéki izom laterális szélétől néhány milliméterre laterálisan kell megtenni. A petefészket ki kell emelni a hasüregből és aszeptikus területre helyezni. A petefészket a petevezeték és a méhtest találkozásánál le kell választani. Miután meggyőződtünk arról, hogy nem lépett fel súlyos vérzés, a hasfalat varrattal, a bőrt pedig kapcsokkal vagy megfelelő varrattal kell zárni. A ligációs pontokat sematikusan az 1. ábra mutatja be. Megfelelő posztoperatív fájdalomcsillapítást kell alkalmazni a rágcsálóellátásban jártas állatorvos ajánlása szerint.

▼M5

Testtömeg

32. Az ovx-felnőtt módszernél a testtömeg és a méh tömege nincs korrelációban, mert a méh tömegét a hormonok – mint az ösztrogének – befolyásolják ugyan, de a testméretet szabályozó növekedési faktorok nem. Ezzel ellentétben, az éretlen modellben az érés során a testtömeg összefüggésben áll a méh tömegével (34). Ezért a vizsgálat kezdetén az éretlen modellben használt állatok testtömege lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól és az átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözzön. Ez azt jelenti, hogy a tenyésztőnek szabványosítania kell az alomszámot annak érdekében, hogy a különböző anyaállatok utódai közel azonos mennyiségű táplálékhoz jussanak. Az állatokat a randomizált súlyeloszlás módszerével kell besorolni a csoportokba (mind a kontroll-, mind a kezelési csoportokba), hogy az egyes csoportok átlagos testtömege statisztikailag ne különbözzön a többi csoportétól. Figyelembe kell venni, hogy amennyire csak lehetséges, kerülendő az alomtestvérek ugyanabba a kezelési csoportba való besorolása, de a vizsgálathoz használt almok számának növelése nélkül.

Adagolási szintek

33. Annak megállapítása érdekében, hogy a vizsgált vegyi anyag rendelkezik-e *in vivo* ösztrogénszerű hatással, két dóziscsoport és egy kontrollcsoport általában elegendő, és ezt az elrendezést ezért állatjólléti okok miatt előnyben kell részesíteni. Ha a cél a dózis-válasz görbe felállítása vagy az alacsonyabb dózisokra történő extrapoláció, akkor legalább 3 dóziscsoportra van szükség. Ha az ösztrogénaktivitás azonosításán túlmenő információra van szükség (például a hatóérték becslésére), fontolóra kell venni eltérő adagolási rend alkalmazását. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgált vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Ha vivőanyagot használunk a vizsgált anyag beadása során, a kontrollcsoport ugyanakkora mennyiségű vivőanyagot kapjon, mint a kezelési csoportok (vagy a vizsgálati csoportokban alkalmazott legnagyobb mennyiséget, ha eltérés van a különböző csoportok között).

34. Az uterotrofikus biológiai vizsgálat esetében a cél olyan dózisok kiválasztása, amelyek biztosítják az állatok túlélését és amelyek nem okoznak jelentős toxicitást vagy szorongást az állatoknak a vegyi anyag három egymást követő napon maximum 1 000 mg/kg/nap dózisban történő adagolása alatt. Valamennyi adagolási szint ajánlásánál és kiválasztásánál figyelembe kell venni a vizsgált, vagy azzal rokon vegyi anyagok toxicitására és (toxiko)kinetikájára vonatkozóan rendelkezésre álló adatokat. A legnagyobb dózisnál először az LD50 és/vagy akut toxicitási információkat kell figyelembe venni annak érdekében, hogy elkerüljék az állatok elhullását, súlyos szenvedését vagy szorongását (24) (25) (26). A legmagasabb dózisnak a maximális tolerált dózist (MTD) kell képviselnie; az olyan vizsgálatot, amelyet a pozitív uterotrofikus választ indukáló dózisszinten végeznek, szintén el lehet fogadni. Szűrésként a dózisok közötti nagy intervallumok (pl. fél log egység, amely 3,2 dózisprogressziónak felel meg, vagy akár egy log egység) általában elfogadhatók. Ha nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok, akkor dózisbehatároló vizsgálat végezhető az alkalmazandó dózisok meghatározása céljából.

35. Alternatívaként, ha az ösztrogén agonista potenciáját az *in vitro* (vagy *in silico*) adatok alapján meg lehet becsülni, ezek is figyelembe vehetők a dózis kiválasztásakor. Például, a vizsgált vegyi anyagnak azt a mennyiségét, amely a referencia agonistával (etinil-ösztradiol) egyenértékű uterotrofikus válaszokat eredményezne, az etinil-ösztradiolhoz viszonyított relatív *in vitro* potenciája alapján kell megbecsülni. A legnagyobb vizsgálati dózist úgy kapjuk meg, hogy ezt az ekvivalens dózist megszorozzuk egy megfelelő faktorral pl. 10-zel vagy 100-zal.

▼M5

A dózisbehatárolás szempontjai

36. Ha szükséges, néhány állattal előzetes dózisbehatároló vizsgálat végezhető. Ebben a tekintetben az OECD 19. iránymutatását (25) lehet használni, amely meghatározza az állatokban jelentkező toxicitásra vagy szorongásra utaló klinikai tüneteket. Ha a háromnapos adagolással járó dózisbehatároló vizsgálatban megvalósítható, a méheket körülbelül 24 órával az utolsó dózis után lehet kimetszeni és megmérni. Ezek az adatokat azután felhasználhatók a fő vizsgálat elrendezésének megtervezésében (az elfogadható maximális és alacsonyabb dózisok kiválasztása, javaslattétel a dóziscsoportok számára).

A dózisok beadása

37. A vizsgált vegyi anyagot orális szondán keresztül vagy szubkután injekció formájában adagolják. Az állatjóléti és toxikológiai szempontokat, mint például a vegyi anyaggal való emberi expozíciós útvonallal kapcsolatos relevanciát (pl. gyomorszonda a lenyelés modellezésére, bőr alá adott injekció a belégzés vagy bőrön át történő adszorpció modellezésére), a vizsgálati vegyi anyag fizikai/kémiai tulajdonságait és különösen az anyagcserével és a kinetikával kapcsolatban rendelkezésre álló toxikológiai információkat és adatokat (pl. first pass metabolizmus elkerülése, jobb hatásfok adott útvonalon keresztül) egyaránt figyelembe kell venni a beadás útvonalának kiválasztásakor.

38. Ahol csak lehetséges, először valamilyen vizes oldat/szuszpenzió használatát kell megfontolni. De mivel a legtöbb ösztrogén ligandum vagy azok metabolikus prekurzorai általában hidrofóbok, a leggyakoribb megközelítés az, hogy olajos oldatot/szuszpenziót használnak (pl. kukorica-, mogyoró-, szezám- vagy olívaolaj). Ezek az olajok azonban különböző kalória- és zsírtartalommal rendelkeznek, így a vivőanyag befolyásolhatja a teljes metabolizálható energiabevitelt (ME), megváltoztatva ezáltal a potenciálisan mért végpontokat, mint például a méh tömegét, különösen az éretlen módszer esetében (33). Ezért a vizsgálat előtt a használni tervezett valamennyi vivőanyagot le kell tesztelni vivőanyag nélküli kontrollokkal szemben. A vizsgált vegyi anyagokat fel lehet oldani minimális mennyiségű 95 %-os etanolban vagy más megfelelő oldószerben, majd a vizsgálati vivőanyaggal felhígítani a végső munkakoncentrációra. Az oldószer toxikus jellemzőit ismerni kell, és le is kell tesztelni egy külön csak oldószert tartalmazó kontrollcsoportban. Ha a vizsgált anyag stabilnak tekinthető, enyhe melegítést és erőteljes mechanikai hatást is lehet használni a vizsgált vegyi anyag feloldása során. Meg kell határozni azt is, hogy a vizsgált vegyi anyag mennyire stabil az adott vivőanyagban. Ha a vizsgált vegyi anyag a vizsgálat időtartama alatt stabil marad, akkor előállítható a vizsgált vegyi anyag kiindulási aliquotja, és a meghatározott adagolási hígítások naponta elkészíthetők.

39. Az adagolás időzítése függ az alkalmazott modelltől (az éretlen modellt lásd a 29. bekezdésben, az ovx-felnőtt modellt pedig a 30. bekezdésben). Az éretlen nőstény patkányoknak a vizsgált vegyi anyagot naponta kell adagolni három egymást követő napon át. Háromnapos kezelés ajánlott ovariektomizált nőstény patkányok esetében is, de hosszabb expozíciók is elfogadhatók, mert javíthatják a gyenge aktivitású vegyi anyagok kimutatását. Ovariektomizált nőstény egerek esetében a háromnapos adagolási időtartamnak elegendőnek kell lennie anélkül, hogy erős ösztrogén agonisták esetében jelentős előny származna az akár hétnaposra való kiterjesztésből; gyenge ösztrogének esetében azonban ez az összefüggés nem volt kimutatható a validálási vizsgálatban (16), így ovx-felnőtt egerekben az adagolást ki kell terjeszteni akár 7 egymást követő napra.A dózist minden nap hasonló időpontban kell beadni. A dózisokat szükség esetén ki kell igazítani, hogy az állat testtömegére vetítve állandó dózisszintet lehessen fenntartani (pl. mg vizsgált vegyi anyag per testtömeg kg per nap). Ami a beadott anyag volumenét illeti, a testtömegre vetített variabilitást az adagolt oldat koncentrációjának beállításával minimálisra kell csökkenteni annak érdekében, hogy a testtömegre vetítve állandó térfogatú anyagot lehessen beadni az állatoknak valamennyi dózisszinten és bármely beadási mód esetén.

▼M5

40. Ha a vizsgált vegyi anyagot szondán át adagoljuk, lehetőleg egyetlen napi adagban kell azt gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át beadni. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. A állatgondozásra vonatkozó helyi iránymutatásokat be kell tartani, de a volumen nem haladhatja meg az 5 ml/testtömeg kg értéket, kivéve a vizes oldatok esetében, ahol 10 ml/testtömeg kg volument lehet használni.

41. Amikor a vizsgált anyag beadása szubkután injekció formájában történik, ezt napi egyszeri adaggal kell végrehajtani. A dózisokat a dorsoscapuláris vagy a lumbális régióba kell beadni steril (pl. 23-as vagy 25-ös méretű) tűvel és tuberkulin fecskendővel. Az injekció beadásának helyén a borotválás nem kötelező. Minden veszteséget, a beadás helyén történt szivárgást vagy nem teljes adagolást fel kell jegyezni. A patkányonként naponta injektált teljes térfogat nem haladhatja meg az 5 ml/testtömeg kg értéket, szétosztva 2 injektálási helyre, kivéve a vizes oldatokat, ahol 10 ml/testtömeg kg mennyiséget lehet használni.

Megfigyelések

Általános és klinikai megfigyelések

42. Általános klinikai megfigyeléseket legalább naponta kell végezni, vagy gyakrabban, ha toxicitás jelei figyelhetők meg. A megfigyeléseket lehetőleg minden nap ugyanabban az időpontban vagy időpontokban kell végezni, figyelembe véve az adagolást követően várható hatások csúcsidőszakait. Valamennyi állatot meg kell figyelni a mortalitás és morbiditás előfordulására, valamint az általános klinikai tünetekre, mint például a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapota, a váladékok és kiválasztott anyagok előfordulása, valamint az autonóm aktivitás (például könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupillaméret, szokatlan légzési ritmusok) tekintetében megfigyelhető változásokra.

Testtömeg és táplálékfogyasztás

43. Minden állatot naponta, 0,1 grammos pontossággal kell megmérni, közvetlenül a kezelés megkezdése előtt, azaz amikor az állatokat beosztják a csoportokba. Opcionális mérésként a kezelési időszak alatt elfogyasztott takarmány mennyiségét is meg lehet mérni a takarmányadagolók súlyának ketrecenkénti megmérésével. A takarmányfogyasztási eredményeket gramm/patkány/nap értékben kell megadni.

Boncolás és a méh tömegének mérése

44. Huszonnégy órával az utolsó kezelés után a patkányokat humánusan el kell pusztítani. Ideális esetben a csoportok közötti boncolási sorrend véletlenszerűen kerül meghatározásra, hogy el lehessen kerülni a kezelési csoportok közvetlenül felfelé vagy lefelé irányuló progresszióját, ami kismértékben befolyásolná az adatokat. A biológiai vizsgálat célja az, hogy megmérje mind a nedves, mind a leitatott méh tömegét. A nedves tömeg magában foglalja a méh és a luminális folyadék tömegét. A leitatott tömeget azután kell mérni, hogy a méh luminális tartalmát kipréseltük és eltávolítottuk.

45. A boncolás előtt az éretlen állatokat meg kell vizsgálni, hogy kinyílt-e a hüvelyük. A boncolás azzal kezdődik, hogy a hasfalat az ágyéki symphysisnél kezdve megnyitjuk. Ezután a méhszarvat és a petefészkeket, ha vannak, elválasztjuk a dorzális hasfaltól. A húgyhólyagot és húgyvezetékeket eltávolítjuk a méh és a hüvely ventrális és laterális oldaláról. A végbél és a hüvely közötti fibrózus tapadást szétválasztjuk, amíg a vagina nyílásának és a gát bőrének találkozását be nem lehet azonosítani. A hüvely falát a vagina és a perineum bőre közötti találkozás fölött átvágva a méhet és a hüvelyt leválasztjuk a testről, amint az a 2. ábrán látható. A méhet a test faláról a méhszarvak dorzolaterális aspektusához teljes hosszuk mentén csatlakozó mesenterium finom átvágásával kell lefejteni. A testből történő eltávolítás után a méhet gyorsan kell kezelni a szövetek kiszáradásának elkerülése érdekében. A kiszáradás miatti tömegcsökkenés nagyobb jelentőségű a

▼M5

kis szövetek, például a méh esetében (23). Ha jelen vannak a petefészkek, el kell távolítani azokat a petevezetékről, elkerülve a méhszarvon keresztüli luminális folyadékveszteséget. Ha az állat már ovariektomizált, a csonkokat meg kell vizsgálni petefészekszövet jelenlétére. A felesleges zsír- és kötőszövetet le kell metszeni. A hüvelyt közvetlenül a méhnyak alatt távolítjuk el a méhről úgy, hogy a méhnyak a méhtesttel együtt maradjon, amint az a 2. ábrán látható.

46. Minden méhet egyedileg megjelölt és lemért tartályba kell helyezni (pl. Petri-csészébe vagy műanyag mérőtálkába), folyamatosan gondoskodva arról, hogy a méhek ne száradjanak ki mérés előtt (pl. sóoldattal kissé megnedvesített szűrőpapírt lehet elhelyezni a tartályban). A méhet a luminális folyadékkal együtt kell megmérni, 0,1 mg pontossággal (nedves méhtömeg).

47. A méhekből ezután egyenként el kell távolítani a luminális folyadékot. Ehhez mindkét méhszarvat kiszúrjuk vagy hosszában felvágjuk. A méhet enyhén megnedvesített szűrőpapírra helyezzük (pl. Whatman No. 3), majd egy második darab enyhén megnedvesített szűrőpapírral enyhén megnyomjuk a luminális folyadék teljes eltávolítása céljából. A méhet a luminális folyadék nélkül is megmérjük, 0,1 mg pontossággal (leitatott méhtömeg).

48. A vizsgálat befejezésekor mért méhtömeget annak igazolására lehet felhasználni, hogy az éretlen intakt patkányok megfelelő életkorát nem haladták meg, ebben a tekintetben azonban a laboratóriumban használt patkánytörzsre vonatkozó történeti adatok a mérvadóak (az eredmények értelmezéséért lásd az 56. bekezdést).

Választható vizsgálatok

49. A méhet a mérlegelés után 10 %-os semleges pufferelt formalinban lehet rögzíteni, hogy hematoxilin-eozin (HE) festés után szövettanilag is meg lehessen vizsgálni. A hüvelyt is ennek megfelelően lehet megvizsgálni (lásd a 9. bekezdést). Ezen túlmenően, a mennyiségi összehasonlítás érdekében az endometriális epithelium morfometriai mérése is elvégezhető.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

50. A vizsgálati adatoknak a következőket kell tartalmazniuk:

— az állatok száma a vizsgálat kezdetekor,

— a vizsgálat során elhullott vagy humánus okokból elpusztított állatok száma és azonosítója, valamint az elhullás vagy humánus elpusztítás dátuma és időpontja,

— a toxicitás jeleit mutató állatok száma és azonosítója, valamint a megfigyelt toxicitási tünetek leírása, beleértve a toxikus hatások kezdetének időpontját, azok időtartamát és súlyosságát, és

— a léziókat mutató állatok száma és azonosítója, valamint a léziók típusának leírása.

▼M5

51. Az állatok egyedi adatai között rögzíteni kell a testtömeget, a nedves méh tömegét, és a leitatott méh tömegét. Az agonisták esetében egyoldalú statisztikai elemzéseket kell használni annak meghatározására, hogy a vizsgált vegyi anyag adagolása eredményezett-e statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) növekedést a méh tömegében. Megfelelő statisztikai elemzést kell végezni, hogy teszteljék a leitatott és nedves méhtömeg kezeléssel kapcsolatos változásait. Az adatokat például a kovariancia elemzésével (ANCOVA) is ki lehet értékelni, kovariánsként a boncoláskor mért testtömeget használva. Variancia-stabilizáló logaritmikus transzformációt lehet végezni a méhadatokon az adatok elemzését megelőzően. Az egyes dóziscsoportok vivőanyag kontrollcsoportokkal való páros összehasonlításához és a konfidencia intervallumok kiszámításához a Dunnett-Hsu teszt alkalmazható. Az esetleges kirívó esetek detektálására és a varianciák homogenitásának értékelésére a studentizált reziduális pontok használhatók. Ezeket az eljárásokat alkalmazták az OECD validálási program során, a Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary, NC), 8-as verzió PROC GLM funkciójának használatával (6) (7).

52. A záró jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell:

Vizsgáló intézmény:

— a felelős személyzet és a vizsgálattal kapcsolatos felelősségi körök,

— a kiindulási pozitív kontrollvizsgálat adatai és az időszakos pozitív kontrolladatok (lásd a 26. és a 27. bekezdést).

Vizsgált vegyi anyag:

— a vizsgált vegyi anyag jellemzői,

— fizikai jelleg és adott esetben a fizikai és kémiai tulajdonságok,

— a hígítások készítésének módja és gyakorisága,

— a stabilitással kapcsolatban kapott adatok,

— az adagoló oldatok analízisei.

Vivőanyag:

— a vizsgálati vivőanyag jellemzői (jellege, szállítója és tételszáma),

— a választott vivőanyag indokolása (ha az nem víz).

Kísérleti állatok:

— faj és törzs, illetve megválasztásuk indokolása,

— szállító és konkrét szállítóeszköz,

— szállításkori életkor a születési dátummal,

— éretlen állatok esetében annak megadása, hogy anyaállattal vagy nevelt állattal együtt szállították-e őket, illetve az elválasztás dátuma,

— az állatok akklimatizációs eljárásának részletei,

— az állatok ketrecenkénti száma,

— az egyes állatok és a csoportok azonosításának részletei és módja.

A vizsgálat körülményei:

— a randomizálási folyamat részletei (az alkalmazott módszer),

— a dózis kiválasztásának indoklása,

▼M5

— a vizsgált vegyi anyag formulázásával, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenitásával kapcsolatos adatok,

— a vizsgált vegyi anyag adagolásának részletei és az expozíciós útvonal kiválasztásának indoklása,

— takarmány (név, típus, szállító, beltartalom, és ha ismert, a fitoösztrogének szintje),

— vízforrás (pl. csapvíz vagy szűrt víz) és a vízellátás módja (nagy tartályból csövön keresztül, palackban stb.),

— alom (név, típus, szállító, beltartalom),

— a ketreces tartás feltételeinek leírása, világítási intervallum, a helyiség hőmérséklete és páratartalma, takarítás,

— a boncolás és a méh mérlegelésére szolgáló eljárások részletes leírása,

— a statisztikai eljárások leírása.

Eredmények

Minden egyes állat esetében:

— egyéni testtömegek naponta (a csoportokba történő besorolástól a boncolásig) (0,1 gramm pontossággal),

— az egyes állatok életkora a vizsgált vegyi anyag adagolásának megkezdésekor (napokban számolva, a születés napját a 0. napnak tekintve),

— az egyes dózisok beadásának dátuma és időpontja,

— a beadott adagok számított térfogat és dózisa, valamint a beadás alatti vagy utáni veszteségekre vonatkozó megfigyelések,

— az állat állapotára vonatkozó napi feljegyzések, beleértve a lényeges tüneteket és megfigyeléseket,

— az elhullás feltételezhető oka (ha vizsgálat alatt haldokló vagy halott állapotban találták az állatot),

— a humánus elpusztítás dátuma és időpontja az utolsó adagolástól számított időintervallummal,

— a nedves méh tömege (0,1 mg pontossággal), valamint a boncolás és mérésére történő előkészítés alatti luminális folyadékvesztéssel kapcsolatos megfigyelések,

— a leitatott méh tömege (0,1 mg pontossággal).

Minden állatcsoport esetében:

— átlagos napi testtömeg (0,1 mg pontossággal) és szórás (a csoportokba sorolástól a boncolásig),

— átlagos nedves méhtömeg és átlagos leitatott méhtömeg (0,1 mg pontossággal), szórások,

— ha mértük, a napi takarmányfogyasztás (elfogyasztott takarmány gramm/állat),

▼M5

— a kezelési csoportok nedves és leitatott méhtömegeit a vivőanyag kontrollcsoportok megegyező adataival összehasonlító statisztikai elemzések eredményei,

— a kezelési csoportok teljes testtömegét és testtömeg-gyarapodását a vivőanyag kontrollcsoportok megegyező adataival összehasonlító statisztikai elemzések eredményei.

53. A vizsgálati módszer legfontosabb tényezőinek összefoglalása

	Patkány	Egér
Állatok		
Törzs	Általánosan használt laboratóriumi rágcsálótörzs	
Az állatok száma	Dóziscsoportonként legalább hat állat	
A csoportok száma	Legalább két tesztcsoport (útmutatásért lásd a 33. bekezdést) és egy negatív kontrollcsoport A pozitív kontrollcsoportra vonatkozó útmutatásért lásd a 26. és 27. bekezdést	
Tartási és etetési körülmények		
T° az állatok tartására szolgáló helyiségben	22 °C ± 3 °C	
Relatív páratartalom	50-60 %, de nem kevesebb, mint 30 % és nem több, mint 70 %	
Napi világítási elrendezés	12 óra világos, 12 óra sötét	
Étrend és ivóvíz	Ad libitum	
Tartás	Egyedileg vagy legfeljebb három egyedből álló csoportokban (éretlen állatok esetében társas csoportos tartás ajánlott)	
Étrend és alom	Az étrendben és az alomban alacsony fitoösztrogénszint ajánlott	
Protokoll		
Módszer	Éretlen nem ovariektomizált módszer (előnyben részesített módszer). Ovariektomizált felnőtt nőstény módszer	Ovariektomizált felnőtt nőstény módszer
Az éretlen állatok életkora az adagoláskor	Legkorábban PND 18. Az adagolást a PND 25 előtt be kell fejezni.	A jelenlegi vizsgálati módszer szempontjából nem releváns.
Életkor az ovariektómia időpontjában	6 és 8 hetes kor között.	
Az ovariektomizált állatok életkora az adagoláskor	A petefészkek eltávolítása és az adagolás első napja között legalább 14 napnak kell eltelnie.	A petefészkek eltávolítása és az adagolás első napja között legalább 7 napnak kell eltelnie.
Testtömeg	Az állatok testtömege lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól, és az átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözhet.	

▼M5

	Patkány	Egér
Adagolás		
Az adagolás módja	Gyomorszonda vagy szubkután injekció	
Az adagolás gyakorisága	Napi egyszeri dózis	
Adagolandó térfogat gyomorszondához vagy szubkután injekcióhoz	≤ 5 ml/testtömeg kg (vagy max. 10 ml/testtömeg kg vizes oldat esetében) (2 injektálási helyre szétosztva a szubkután módszer esetében)	
Az adagolás időtartama	Három egymást követő nap az éretlen modell esetében Legalább három egymást követő nap az OVX-modell esetében	Hét egymást követő nap az OVX-modell esetében
Boncolás időpontja	Körülbelül 24 órával az utolsó dózis után	
Eredmények		
Pozitív válasz	Az átlagos méhtömeg statisztikailag szignifikáns növekedése (nedves és/vagy leitatott)	
Referencia ösztrogén	17α-etinil-ösztradiol	

ÚTMUTATÁS AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSÉHEZ ÉS ELFOGADÁSÁHOZ

54. Általánosságban, az ösztrogénszerű hatás kimutatását szolgáló tesztet pozitívnak kell tekinteni, ha a méh tömege legalább a magas dózis esetében statisztikailag szignifikáns növekedést mutat ($p< 0,05$), az oldószer kontrollcsoporttal összehasonlítva. A pozitív eredményt ezenkívül alátámaszthatja, ha biológiailag elfogadható kapcsolatot lehet kimutatni a dózis és a válasz nagysága között, szem előtt tartva, hogy a vizsgált vegyi anyag egymást átfedő ösztrogén és antiösztrogén aktivitása hatással lehet a dózis-válasz görbére.

55. Ügyelni kell arra, hogy az adatok értelmezhetősége érdekében ne lépjük túl a maximális tolerált dózist. Ebből a szempontból a testtömeg csökkenését, a klinikai tüneteket és az egyéb megfigyeléseket alaposan meg kell vizsgálni.

56. Az uterotrofikus biológiai vizsgálat adatainak elfogadhatósága szempontjából fontos adat a méh tömege a vivőanyag kontrollcsoportban. A magas kontrollértékek megkérdőjelezhetik a biológiai vizsgálat érzékenységét és a nagyon gyenge ösztrogén agonisták kimutatására való képességét. A szakirodalom és az uterotrofikus biológiai vizsgálat validálása során kapott adatok azt mutatják, hogy magas kontrollátlagok spontán módon is előfordulhatnak, különösen éretlen állatokban (2) (3) (6) (9). Mivel a méh tömege éretlen patkányok esetében sok változótól függ, mint például a törzs vagy a testtömeg, nem adható meg konkrét felső érték a méh tömegére. Iránymutatásként, ha a leitatott méh tömege éretlen kontrollpatkányokban 40 és 45 mg között van, az eredményeket gyanúsnak kell tekinteni, a 45 mg feletti méhtömegek pedig a vizsgálat megismétlését tehetik szükségessé. Ezt azonban eseti elbírálás alapján kell mérlegelni (3) (6) (8). Felnőtt patkányok vizsgálatakor a nem teljes ovariektómia után petefészekszövet maradhat vissza, amely endogén ösztrogént termelhet és késleltetheti a méh tömegének regresszióját.

▼M5

57. A leitatott vivőanyagos kontrollcsoportban az éretlen nőstény patkányok esetében a testtömeg 0,09 %-ánál, az ovariektomizált fiatal felnőtt nőstények esetében pedig a testtömeg 0,04 %-ánál alacsonyabb méhtömeg elfogadható eredményeket ad [lásd a 31. táblázatot (2)]. Ha a kontroll méhtömegek magasabbak ezeknél az értékeknél, akkor több tényezőt is alaposan meg kell vizsgálni, beleértve az állatok korát, az ovariektómia megfelelő kivitelezését, az étrendi fitoösztrogéneket, és így tovább, és a vizsgálat negatív eredményét (ösztrogén-aktivitásra utaló jelek nincsenek) óvatosan kell kezelni.

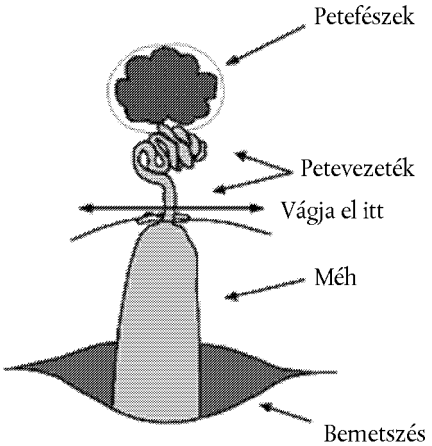
58. A vivőanyag kontrollcsoportra vonatkozó történeti adatokat meg kell őrizni a laboratóriumban. A pozitív referencia ösztrogénre (mint például a 17a-etinil-ösztradiol) adott válaszokkal kapcsolatos történeti adatokat is meg kell őrizni a laboratóriumban. A laboratóriumok az ismert gyenge ösztrogén agonistákra adott válaszokat is tesztelhetik. Mindezen adatok összehasonlíthatók a rendelkezésre álló adatokkal (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) annak igazolására, hogy a laboratóriumi módszerek érzékenysége megfelelő.

59. A leitatott méhtömegek kisebb variabilitást mutattak az OECD validálási vizsgálat során, mint a nedves méhtömegek (6) (7). A bármelyik mérésben adott szignifikáns válasz azonban azt jelzi, hogy a vizsgált vegyi anyag pozitív az ösztrogénaktivitás szempontjából.

60. Az uterotrofikus válasz azonban nem teljesen ösztrogén eredetű, de az uterotrofikus biológiai vizsgálat pozitív eredményét általában úgy kell értelmezni, mint az in vivo ösztrogénpotenciál bizonyítékát, és további tisztázást kell kezdeményezni (lásd a 9. bekezdést és az „OECD Fogalmi keret az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok tesztelésére és értékelésére” c. anyagot, 2. melléklet).

1. ábra

A petefészkek műtéti eltávolításának sematikus ábrája



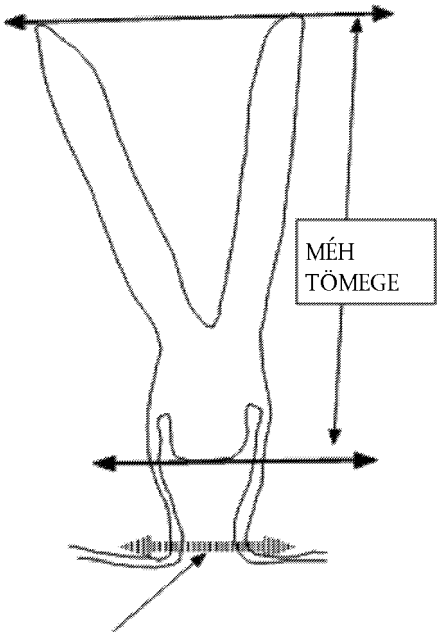
A mesometrium, az erek és a zsírszövet nincsenek feltüntetve

Az eljárás a dorzolaterális hasfalat az alsó bordaszél és a csípőlapát közötti felezőpontban megnyitó kb. 1 cm-es hosszanti bemetszéssel kezdődik, az ágyéki izom laterális szélétől néhány milliméterre laterálisan. A petefészkeket megkeressük a hasüregben. A petefészkeket kiemeljük a hasüregből egy aszeptikus területre, érlekötést helyezünk fel a petefészkek és a méh között a vérzés kontrollálása céljából, majd a petefészkeket a petevezetékek és a méhkürtök találkozásánál az érlekötés feletti átmetszéssel leválasztjuk. Miután meggyőződtünk arról, hogy nem áll fenn jelentősebb mértékű vérzés, a hasfalat varrattal, a bőrt pedig pl. kapcsokkal vagy megfelelő varrattal zárjuk. Az állatoknak a felhasználás előtt legalább 14 napot biztosítunk arra, hogy felépüljenek és a méh tömege minimálisra csökkenjen.

▼**M5**

2. ábra

A méhszövetek eltávolítása és előkészítése a tömeg mérésére.



Az eljárás azzal kezdődik, hogy a hasfalat az ágyéki symphysisnél megnyitjuk. Ezután mindkét petefészket, ha megvannak, és a méhkürtöket leválasztjuk a dorzális hasfalról. A húgyhólyagot és húgyvezetékeket eltávolítjuk a méh és a hüvely ventrális és laterális oldaláról. A végbél és a hüvely közötti fibrózus tapadást szétválasztjuk, amíg a vagina nyílásának és a gát bőrének találkozását be nem lehet azonosítani. A hüvely falát a vagina és a perineum bőre közötti találkozás fölött átvágva a méhet és a hüvelyt leválasztjuk a testről, amint az ábrán látható. A méhet a test faláról a méhszarvak dorzolaterális aspektusához teljes hosszuk mentén csatlakozó mesenterium finom átvágásával kell lefejteni. A testből való eltávolítást követően a felesleges zsír- és kötőszövetet lemetsszük. Ha megvannak a petefészkek, eltávolítjuk őket a petevezetékről, elkerülve a méhszarvon keresztüli luminális folyadékveszteséget. Ha az állat már ovariektomizált, a csonkokat megvizsgáljuk petefészekszövet jelenlétére. A hüvelyt közvetlenül a méhnyak alatt távolítjuk el a méhről úgy, hogy a méhnyak a méhtesttel együtt maradjon, amint az ábrán látható. A méhet ezután meg lehet mérni.

▼M5

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Antiösztrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a 17ß-ösztradiol hatását gátolja.

Vegyi anyag: egy anyag vagy keverék.

Születés napja: a 0. posztnatális nap.

Adagolás: általános fogalom, amely a dózist, valamint az adagolás gyakoriságát és időtartamát foglalja magában.

Dózis: a vizsgált vegyi anyag beadott mennyisége. Az uterotrofikus biológiai vizsgálat esetében a dózist a vizsgált vegyi anyag tömegének és a kísérleti állat egységnyi testtömegének napi hányadosaként (például mg/testtömeg kilogramm/nap) fejezzük ki.

Maximális tolerálható dózis (MTD): a vegyi anyag azon legnagyobb mennyisége, amely a szervezetbe beadva még nem pusztítja el a vizsgált állatokat (jelölése: LD_0) (IUPAC, 1993)

Ösztrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a 17ß-ösztradiolhoz hasonló hatást fejtsen ki.

X. posztnatális nap: az élet X. napja a születés napját követően.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A vizsgálati módszer pontosságának olyan mérőszáma, amely kategorikus eredményre vezet, és amely fontos eszköz a vizsgálati módszer alkalmazhatóságának megítélésében.

Specificitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vizsgált vegyi anyag aránya. A vizsgálati módszer pontosságának olyan mérőszáma, amely kategorikus eredményre vezet, és amely fontos eszköz a vizsgálati módszer alkalmazhatóságának megítélésében.

Vizsgált vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Uterotrofikus: a méh szöveteire gyakorolt pozitív hatás leírására használt fogalom.

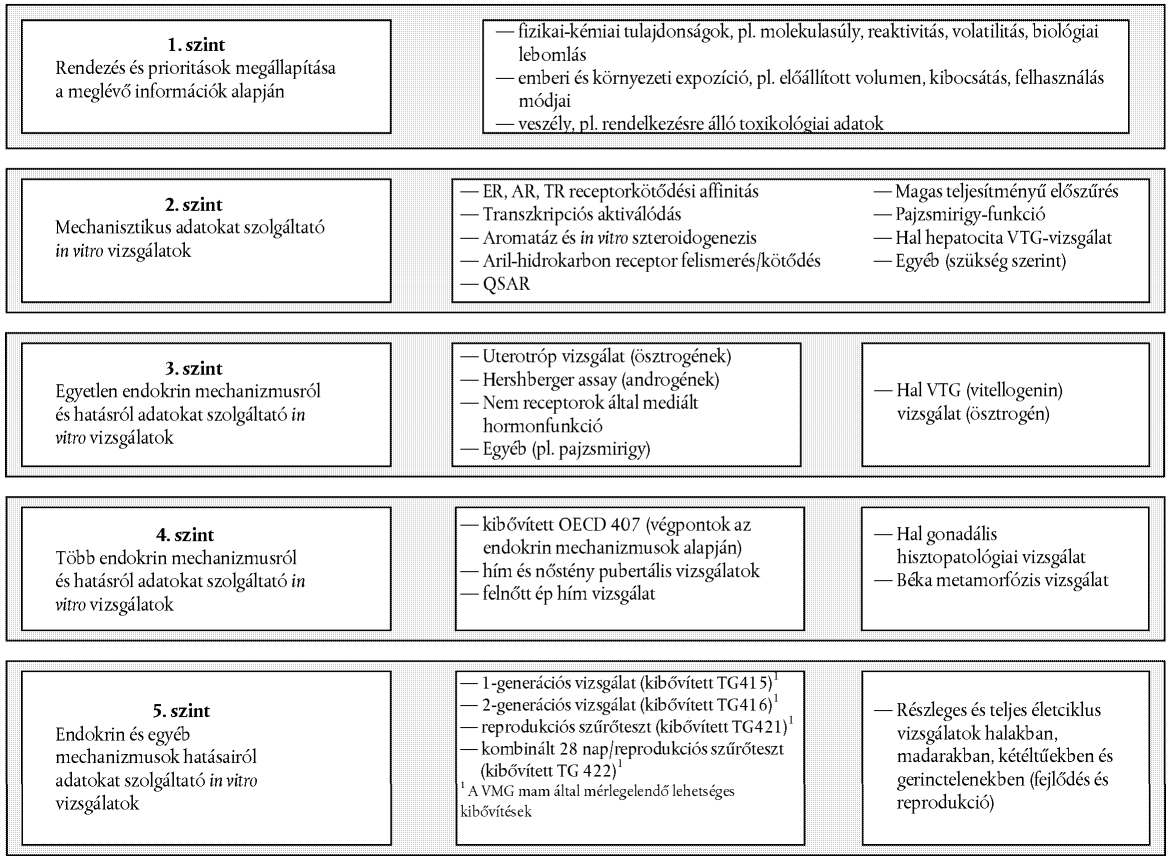
Validáció: tudományos folyamat, amelynek célja egy adott vizsgálati módszer működési követelményeinek és korlátainak jellemzése, valamint megbízhatóságának és egy adott célhoz kapcsolódó relevanciájának igazolása.

▼M5

2. függelék

Megjegyzés: A Test Guidelines Programme titkársága általaz EDTA Task Force 6. Ülésén elért megállapodás alapján készített dokumentum

Az OECD fogalmi kerete az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok tesztelésére és értékelésére



VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment

▼**M5**

MEGJEGYZÉSEK A KERETRENDSZERHEZ

1. megjegyzés: A belépés és kilépés minden szinten lehetséges és a veszély- és kockázatértékelésre szolgáló információs igények jellegétől függ

2. megjegyzés: Az 5-ös szinten az ökotoxikológiának olyan végpontokat is tartalmaznia kell, amelyek jelzik a káros hatások és a potenciális populációs károk mechanizmusait

3. megjegyzés: Amikor egy multimodális modell több egyetlen végpontú vizsgálatot lefed, ez a modell az egyetlen végpontú vizsgálatok helyébe lép

4. megjegyzés: Az egyes vegyi anyagokat eseti alapon kell értékelni, figyelembe véve az összes rendelkezésre álló információt és szem előtt tartva a keretrendszer különböző szintjeinek funkcióját.

5. megjegyzés: A keretrendszert jelenleg nem lehet mindenre kiterjedőnek tekinteni. A 3., 4. és 5. szinten olyan vizsgálatokat foglal magában, amelyek már rendelkezésre állnak vagy amelyek validálása még folyamatban van. Ami az utóbbiakat illeti, ezeket a keretrendszer ideiglenes jelleggel tartalmazza. Miután kifejlesztették és validálták ezeket, hivatalosan is bekerülnek a keretrendszerbe.

6. megjegyzés: Az 5. szintet nem lehet úgy tekinteni, hogy csak végleges teszteket tartalmaz. Az ezen a szinten szerepelő teszteket úgy tekintik, hogy azok hozzájáruljanak az általános veszély- és kockázatértékeléshez

▼M5

SZAKIRODALOM

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10^{th}-11^{th} March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.

(3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445-520.

(4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay – Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.

(5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785-94.

(6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 – Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.

(7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dose Response Studies. Environ. Health Persp.111:1530-1549.

(8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp.111:1550-1558.

(9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two – Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.

(10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [I^{125}]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582-587.

(11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 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, Paris.

(32) Dorfman R.I. (1962). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.

(33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4): 401-416.

▼**M5**

(34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14 (1-2): 159-184.

(35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science, 131:1807-1808.

(36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410-1414.

(37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.

(38) Az Európai Parlament és a Tanács 2010. szeptember 22-i 2010/63/EU irányelve a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről (HL L 276., 2010.10.20., 33. o.).

▼M5

B.55. **HERSHBERGER BIOASSAY PATKÁNYOKBAN: GYORS SZŰRŐVIZSGÁLAT AZ (ANTI)ANDROGÉN TULAJDONSÁGOK KIMUTATÁSÁRA**

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 441. vizsgálati iránymutatásában (2009) leírt módszerrel. 1998-ban az OECD a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint az endokrin rendszert esetlegesen károsító anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó új vizsgálati iránymutatások kidolgozására irányuló, kiemelt fontosságú tevékenységet indított (1). A tevékenység egyik eleme a patkányok Hershberger bioassay vizsgálati iránymutatásának kidolgozása volt. A gyógyszeriparban történt több évtizedes használat után ezt a vizsgálatot először egy hivatalos szakértői bizottság szabványosította az androgén vegyszerek kimutatására szolgáló szűrővizsgálatként 1962-ben (2). A patkány Hershberger bioassay-t 2001 és 2007 között egy alapos validálási programnak vetették alá, beleértve a háttérdokumentum elkészítését (23), a részletes módszerdokumentáció összeállítását (3), a boncolási iránymutatás kifejlesztését (21) és a bioassay megbízhatóságának és reprodukálhatóságának igazolása céljából végzett kiterjedt, laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti vizsgálatokat. Ezeket a validálási vizsgálatokat egy erős referencia androgénnel (tesztoszteron-propionát (TP)), két erős szintetikus androgénnel (trenbolon-acetát és metil-tesztoszteron), egy erős antiandrogén gyógyszerkészítménnyel (flutamid), a természetes androgén (dihidro-tesztoszteron, DHT) szintézisének egy erős inhibitorával (finaszterid), több gyenge antiandrogén peszticiddel (linuron, vinklozolin, procimidon, p,p'-DDE), egy erős 5-α-reduktáz inhibitorral (finaszterid) és két ismert negatív vegyi anyaggal (dinitro-fenol és nonilfenol) végezték el (4) (5) (6) (7) (8). Ez a vizsgálati módszer a bioassay-vel gyűjtött hosszú történeti tapasztalatokon, a validálási tesztprogram során szerzett tapasztalatokon, valamint az ezek keretében kapott eredményeken alapul.

2. A Hershberger bioassay egy rövid távú *in vivo* szűrővizsgálat, amely a hím nemi szervek kiegészítő szöveteit használja. A vizsgálat az 1930-as évekből származik és az 1940-es években módosították, hogy beleépítsék a hím nemi szervek androgénre érzékeny izmait (2) (9-15). Az 1960-as években több mint 700 lehetséges androgént értékeltek a protokoll szabványosított változatával (2) (14), és az 1960-as években ezt a vizsgálatot tartották az androgének és az antiandrogének kimutatására szolgáló standard módszernek (2) (15). A jelenlegi biológiai vizsgálat öt androgénfüggő szövet tömegének változásán alapul kasztrált peripubertális hím patkányokban. A vegyi anyagoknak az androgén agonistákéval, antagonistákéval vagy 5α-reduktáz inhibitorokéval megegyező biológiai aktivitás kiváltására való képességét értékeli. A vizsgálati módszerbe bevont öt androgénfüggő célszövet: ventrális prosztata (VP), ondóhólyag (SV) (plusz a folyadékok és a koaguláló mirigyek), levator ani-bulbocavernosus (LABC) izom, páros Cowper-mirigyek (COW), glans penis (GP). A kasztrált peripubertális hím patkányokban ezek a szövetek abszolút tömegük növekedésével reagálnak az androgénekre. Amikor ugyanezeket a szöveteket erős referencia androgén beadásával arra ösztönzik, hogy növeljék a tömegüket, mind az öt szövet abszolút tömegének csökkenésével reagál az antiandrogénekre. A Hershberger bioassay elsődleges modellje a műtétileg ivartalanított peripubertális hím állat, amelyet a Hershberger validálási program 1., 2. és 3. fázisában validáltak.

3. A Hershberger bioassay az androgén agonisták, androgén antagonisták és 5a-reduktáz inhibitorok mechanisztikus *in vivo* szűrővizsgálatának céljára szolgál, és alkalmazását az „OECD Fogalmi keret az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok tesztelésére és értékelésére” c. (2. függelék) összefüggésében kell szemlélni. Ebben a fogalmi keretben a Hershberger bioassay-t a 3. szint tartalmazza olyan *in vivo* vizsgálatként, amely egyetlen

▼M5

endokrin mechanizmusról, az (anti)adrogénszerű hatásról szolgáltat adatokat. A Hershberger bioassay-t úgy használják, hogy beépítik az endokrin rendszerrel potenciálisan kölcsönhatásba lépő vegyi anyagok azonosítására szolgáló *in vitro* és *in vivo* vizsgálatsorozatba, amely végső soron az emberi egészségre vagy a környezetre gyakorolt veszélyek és kockázatok értékelését célozza.

4. Az ivartalanítással kapcsolatos állatjóléti megfontolások miatt az ép (nem ivartalanított) stimulált elválasztott hím egyedeket választott ák ki alternatív modellként a Hershberger bioassay-hez, hogy a kasztrálási lépés elkerülhető legyen. A stimulált elválasztott vizsgálati módszert validálták (24); a validálási vizsgálatok során azonban a Hershberger bioassay elválasztott változata a tesztelt dózisokban nem bizonyult alkalmasnak a gyenge antiandrogének androgénfüggő szervek tömegére gyakorolt hatásainak következetes érzékelésére. Ezért ezt a vizsgálati módszer nem tartalmazza. Ugyanakkor figyelembe véve, hogy alkalmazása nemcsak állatjóléti előnyökkel jár, de az egyéb hatásmechanizmusokra vonatkozó információkat is nyújthat, a teszt rendelkezésre áll az OECD 115. iránymutatásában (25).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

5. Az androgén agonisták és antagonisták ligandumként hatnak az androgén receptorokra és aktiválhatják vagy gátolhatják a receptor által kontrollált géntranszkripciót. Ezenkívül egyes vegyi anyagok néhány androgén célszövetben gátolják a tesztoszteronnak egy hatásosabb természetes androgénre, a dihidrotesztoszteronra való átalakítását (5a-reduktáz inhibitorok). Az ilyen vegyi anyagok egészségügyi veszélyt jelenthetnek, beleértve a reproduktív és a fejlődési hatásokat. Ezért fennáll a szabályozói igény a vegyi anyagok lehetséges androgén agonista, antagonista vagy 5a-reduktáz inhibitor hatásának gyors felmérésére és értékelésére. Bár informatívak, a ligandum receptorkötődésben mért affinitása egy androgén receptorhoz vagy a riporter gének *in vitro* transzkripciós aktiválása nem az egyetlen meghatározói a lehetséges veszélynek. További tényezők lehetnek a szervezetbe történő belépéskor bekövetkező metabolikus aktiválódás és deaktiválódás, a vegyi anyag célszövetekbe történő disztribúciója, illetve a szervezetből történő kiürülése. Ennek következtében szükség van arra, hogy *in vivo*, azaz aktuális körülmények között és expozíció mellett szűrjék a vegyi anyagok lehetséges aktivitását. Az *in vivo* értékelés kevésbé fontos, ha a vegyi anyag jellemzői a felszívódás-eloszlás-metabolizmus-kiürülés (absorption-distribution-metabolism-elimination, ADME) tekintetében ismertek. Az androgénfüggő szövetek gyors és erőteljes növekedéssel reagálnak az androgének általi stimulációra, különösen a kasztrált peripubertális hím patkányokban. A rágcsálófajokat, különösen a patkányokat, széles körben használják a kockázatok jellemzését célzó toxicitási vizsgálatokra is. Ezért az vizsgálatnak a kasztrált peripubertális patkányokat és az öt célszövetet felhasználó változata alkalmas az androgén agonisták, antagonisták és 5a-reduktáz inhibitorok *in vivo* szűrésére.

6. A vizsgálati módszer az OECD validálási vizsgálatban alkalmazott azon protokollokon alapul, amelyeket a laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti vizsgálatokban megbízhatónak és reprodukálhatónak találtak (4) (5) (6) (7) (8). Ez a vizsgálati módszer mind az androgén, mind az antiandrogén eljárást bemutatja.

7. Bár az OECD Hershberger bioassay validálási program során volt némi eltérés az egyes laboratóriumok között az antiandrogének kimutatására használt TP dózisában (0,2 vagy 0,4 mg/kg/nap, szubkután injekció), alig volt különbség a két protokollváltozat között a gyenge vagy erős antiandrogén aktivitás detektálására vonatkozó képességben. Ugyanakkor egyértelmű, hogy a TP dózisa nem lehet annyira magas, hogy blokkolja a gyenge androgén receptor (AR) antagonisták hatását, vagy olyan alacsony, hogy az androgén szövetek antiandrogén egyidejű alkalmazása nélkül is csak kis növekedési választ mutassanak.

▼M5

8. Az egyes androgénfüggő szövetek által adott növekedési válasz nem teljesen androgén eredetű, az androgén agonistákon kívül más vegyi anyagok is megváltoztathatják egyes szövetek tömegét. Ugyanakkor több szövet egyidejű növekedési válasza inkább androgén-specifikus mechanizmust támaszt alá. Például az erős ösztrogének magas dózisai növelhetik az ondóhólyag tömegét, az vizsgálatba bevont többi androgénfüggő szövet azonban nem ad hasonló választ. Az antiandrogén vegyi anyagok androgénreceptor antagonistaként vagy 5a-reduktáz inhibitorként működhetnek. Az 5a-reduktáz inhibitoroknak változó hatásuk van, mert a hatásosabb dihidrotesztoszteronra történő konverzió szövetenként eltérő mértékű. Az 5α – reduktázt gátló antiandrogének, mint a finaszterid, kifejezettebb hatással bírnak a ventrális prosztatában, mint más szövetekben, összehasonlítva egy potens AR antagonistával, például a flutamiddal. Ezt a szöveti válaszban megmutatkozó különbséget arra lehet használni, hogy különbséget tegyenek az AR által mediált és az 5α – reduktáz által mediált hatásmódok között. Ezen túlmenően, az androgén receptor evolúciósan rokon az egyéb szteroid hormonok receptoraival, és ezért néhány más hormon, ha magas, szuprafiziológiás dózisszinteken adagolják, képes megkötődni és antagonizálni a TP növekedést serkentő hatásait (13). Továbbá az is valószínűnek tűnik, hogy a fokozott szteroid metabolizmus és a szérum tesztoszteronszintjének ennek következtében előálló csökkenése csökkentheti az androgénfüggő szövetek növekedését. Ezért a Hershberger bioassay pozitív eredményét az adatok bizonyító erejének mérlegelésével kell értékelni, beleértve az *in vitro* vizsgálatokat, mint például az AR és az ösztrogén receptor (ER) kötődési vizsgálatokat és a megfelelő transzkripciós aktiválási vizsgálatokat, vagy más *in vivo* vizsgálatokat, amelyek hasonló androgén célszöveteket vizsgálnak, mint például a hím pubertális vizsgálat, a 15 napos ép felnőtt hím vizsgálat, vagy a 28 vagy 90 napos ismételt adagolású vizsgálatok.

9. A tapasztalat azt mutatja, hogy a xenobiotikum androgének ritkábbak, mint a xenobiotikum antiandrogének. A várakozások szerint ezért a Hershberger bioassay-t a leggyakrabban antiandrogének szűrésére fogják használni. Azonban az androgének tesztelésére szolgáló eljárás is ajánlható szteroid vagy szteroidszerű vegyi anyagok, illetve olyan vegyi anyagok esetében, amelyeknél a lehetséges androgén hatásra vonatkozó jelzés a fogalmi keret 1. vagy 2. szintjében foglalt módszerekből származik (2. számú melléklet). Hasonlóképpen, ha esetleg az 5. szintű vizsgálatokban (anti)androgén profilokkal összefüggő káros hatásokat lehet megfigyelni, akkor fel kell mérni, hogy a vegyi anyag endokrin hatásmechanizmus alapján működik-e.

10. Minden állatkísérleteken alapuló eljárást az állatgondozásra vonatkozó helyi szabványoknak megfelelően kell végrehajtani; az alábbiakban foglalt, gondozásra és kezelésre vonatkozó leírások minimális teljesítményszabványok, amelyeket a helyi szabályozások – mint például a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63/EU európai parlamenti és tanácsi irányelv (2010. szeptember 22.) (26) – felülírnak (38). Az állatokkal való humánus bánásmódról szóló további iránymutatás a megfelelő OECD-kiadványban található (17).

11. Mint minden, kísérleti állatokat felhasználó biológiai vizsgálatnál, itt is alaposan meg kell fontolni, hogy el kell-e egyáltalán végezni ezt a vizsgálatot. Alapvetően két okból lehet egy ilyen döntést hozni:

— magas expozíciós potenciál (a fogalmi keret 1-es szintje) vagy az *in vitro* vizsgálatokban megfigyelt (anti)androgénszerű hatásra utaló jelek (2. szint) esetén annak alátámasztását célzó vizsgálatok, hogy az ilyen hatások *in vivo* is előfordulhatnak-e,

— a 4. vagy 5. szintű *in vivo* vizsgálatokban az (anti)androgenitással összhangban álló hatások esetén a konkrét hatásmechanizmust alátámasztó vizsgálatok, pl. annak meghatározására, hogy a hatások (anti)androgén mechanizmus miatt léptek-e fel.

▼M5

12. Az ebben a vizsgálati módszerben használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

13. A Hershberger bioassay érzékenységéhez minimális mennyiségű endogén androgént termelő hím állatokra van szükség. Ez ivartalanított hím állatok használatával érhető el, feltéve, hogy a kasztrálás után elegendő időt biztosítottak a célszövetek minimumra való visszafejlődéséhez és az egységes kiindulási tömeg eléréséhez. Így a potenciális androgén aktivitás szűrésekor a keringő endogén androgének szintje alacsony, a hipotalamusz-agyalapi mirigy-gonád tengely nem képes a visszacsatolási mechanizmusok révén a kompenzációra, a szövetek reagálóképessége maximális, a szövet kiindulási tömegének variabilitása pedig minimális. A potenciális antiandrogén aktivitás szűrésekor következetesebb szöveti tömeggyarapodás érhető el, ha a szöveteket referencia androgénnel stimuláljuk. Ennek eredményeként a Hershberger bioassay-hez csak 6 állatra van szükség dóziscsoportonként, míg az ép pubertáskorú vagy felnőtt hím egyedekkel végzett más vizsgálatokban dóziscsoportonként 15 hím állat vizsgálata javasolt.

14. A peripubertális hím patkányok ivartalanítását a megfelelő módon kell elvégezni az elfogadott érzéstelenítési és aszeptikus technikák alkalmazásával. A műtét utáni első néhány napban fájdalomcsillapítót kell adni műtét utáni kellemetlen érzés megszüntetéséhez. A kasztráció annak révén növeli a vizsgálat pontosságát a gyenge androgének és az antiandrogének felismerése terén, hogy megszünteti az intakt állatokban jelen lévő kompenzációs endokrin feed-back mechanizmusokat, amelyek csökkenthetik a beadott androgének és antiandrogének hatását, valamint hogy kizárja a szérum tesztoszteron-szintjének egyedek közötti nagymértékű variabilitását. Ezért a kasztráció csökkenti az ezen endokrin aktivitások szűréséhez szükséges állatok számát.

15. Amikor a szűrés potenciális androgén aktivitás detektálása céljából történik, a vizsgált vegyi anyagot tíz egymást követő napon át naponta adjuk be az állatoknak gyomorszondán át orálisan vagy szubkután (sc.) injekció formájában. A vizsgált vegyi anyagokat a kísérleti állatok legalább két kezelési csoportjának adjuk be, csoportonként egy dózisszintet használva. Az állatokat körülbelül 24 órával az utolsó dózis után felboncoljuk. Két vagy több célszerv tömegének a vivőanyag kontrollcsoporthoz viszonyított statisztikailag szignifikáns növekedése a vizsgált vegyi anyag csoportokban azt jelzi, hogy a vizsgált vegyi anyag pozitív a potenciális androgén aktivitás szempontjából (lásd a 60. bekezdést). Az olyan androgének, mint a trenbolon, amelyeket az 5α – reduktáz nem alakít át, kifejezettebb hatást gyakorolnak az LABC-re és a GP-re, mint a TP, de minden szövetnek nagyobb növekedést kell mutatnia.

16. Amikor a szűrés potenciális antiandrogén aktivitás detektálása céljából történik, a vizsgált vegyi anyagot tíz egymást követő napon át naponta adjuk be az állatoknak gyomorszondán át orálisan vagy szubkután injekció formájában, és az állatok naponta sc injekció formájában TP dózisokat is kapnak (0,2 vagy 0,4 mg/kg/nap). A validálási programban azt állapították meg, hogy 0,2 vagy 0,4 mg/kg/nap TP-dózist is lehet használni, mivel mindkét dózis alkalmas volt az antiandrogének kimutatására, ezért az egyik dózist ki kell választani a vizsgálatban történő használat céljára. A vizsgált vegyi anyag fokozatos dózisait adjuk be a kísérleti állatok legalább három kezelési csoportjának, csoportonként egy dózisszintet használva. Az állatokat körülbelül 24 órával az utolsó dózis után felboncoljuk. Két vagy több célszerv tömegének statisztikailag szignifikáns csökkenése a vizsgált vegyi anyag plusz TP csoportban csak a TP kontrollcsoporttal összehasonlítva azt jelzi, hogy a vizsgált vegyi anyag pozitív potenciális antiandrogén aktivitásra (lásd a 61. bekezdést).

▼M5

A MÓDSZER ISMERTETÉSE

A faj és a törzs kiválasztása

17. A patkányt már az 1930-as évek óta rutinszerűen használják a Hershberger bioassay-ben. Bár biológiailag valószínű, hogy a patkány és az egér hasonló válaszokat adna, a patkánymodellel szerzett 70 éves tapasztalat alapján a patkány a kiválasztott faj a Hershberger bioassay-hez. Ezenkívül, mivel a Hershberger bioassay eredménye egy hosszú távú multigenerációs vizsgálat előzménye lehet, mindkét kísérlethez csak ugyanabból a fajból és törzsből származó, azonos eredetű állatokat használhatunk.

18. Ez a protokoll lehetővé teszi a laboratóriumoknak, hogy kiválasszák a vizsgálati eljárásban alkalmazandó patkánytörzset, amelynek általánosságban ugyanannak kell lennie, mint a részt vevő laboratórium által történetileg használt törzs. Az általánosan használt laboratóriumi patkánytörzsek is használhatók; 42 napos kornál lényegesen később érő törzseket azonban nem szabad használni, mivel ezeknek a hímeknek a 42 napos korban történő kasztrációja megelőzheti a glans penis tömegének mérését, amelyet csak akkor lehet elvégezni, miután a fityma elkülönült a pénisztesttől. Így a Fisher 344 patkánytól származó törzseket nem szabad használni, ritka esetektől eltekintve. A Fisher 344 patkány szexuális fejlődésének más, általánosabban használt törzsekkel, például a Sprague-Dawley- vagy a Wistar-törzzsel (16) összehasonlítva eltérő az időzítése. Ha ilyen törzset kívánnak használni, akkor a laboratóriumnak egy kicsit idősebb korban kell ivartalanítania az állatokat, és demonstrálnia kell az alkalmazott törzs érzékenységét is. A patkánytörzs kiválasztását a laboratóriumnak egyértelműen meg kell indokolnia. Ha a szűrővizsgálat egy ismételt adagolású orális vizsgálat, reproduktív és fejlődési vizsgálat, vagy hosszú távú vizsgálat bevezetője lehet, akkor lehetőleg minden vizsgálathoz ugyanabból a törzsből való, azonos eredetű állatokat kell használni.

Tartási és etetési körülmények

19. Minden eljárásnak meg kell felelnie a laboratóriumi állatgondozásra vonatkozó valamennyi helyi szabványnak. Ezek a gondozásra és kezelésre vonatkozó leírások minimális teljesítményszabványok, amelyeket a szigorúbb helyi szabályozások – mint például a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63/EU európai parlamenti és tanácsi irányelv (2010. szeptember 22.) (26) – felülírnak (38). A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének 22 °C-nak (kb. ±3 °C eltérési tartománnyal) kell lennie. A helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot. A relatív páratartalom célértékének 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges. Naponta 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást.

20. Az állatok fiatal kora miatt és mert a patkányok társas lények, a csoportos tartás előnyösebb az elszigeteltséggel szemben. Ketrecenként két-három állat elhelyezése révén elkerülhető a zsúfoltság és a hozzá kapcsolódó stressz, amely zavarhatja a járulékos ivarszervi szövetek fejlődésének hormonális szabályozását. A szennyező anyagok eltávolítása érdekében a ketreceket alaposan meg kell tisztítani és úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezésének lehetséges hatásait. Megfelelő méretű (~2 000 négyzetcentiméter) ketrecek alkalmazásával megakadályozható a túlzsúfoltság.

21. Valamennyi állatot humánus módszerrel egyedileg kell azonosítani (pl. füljelölés vagy krotália). Az azonosításra használt módszert fel kell jegyezni.

▼M5

22. A laboratóriumi takarmányt és az ivóvizet korlátozás nélkül kell biztosítani. A Hershberger bioassay-t végző laboratóriumoknak azt a laboratóriumi takarmányt kell használniuk, amelyet a vegyi anyagok tesztelése során általánosan használnak. A bioassay validálási vizsgálataiban az étrendre visszavezethető hatás vagy variabilitás nem volt megfigyelhető. Az alkalmazott étrendet fel kell jegyezni és a laboratóriumi takarmány mintáját az esetleges későbbi analízishez meg kell őrizni.

Alkalmassági kritériumok az androgénfüggő szervek tömegének méréséhez

23. A validációs vizsgálat során nem találtak bizonyítékot arra, hogy a testtömeg csökkenése befolyásolta volna a célszövetek tömegének növekedését vagy csökkenését (amelyet súlyozni kellene a vizsgálatban).

24. A validálási programban sikeresen alkalmazott patkánytörzseknél az androgénfüggő szervek tömege nagyobb a nehezebb patkánytörzsekben, mint a könnyebb törzsekben. Ezért a Hershberger bioassay teljesítménykritériumai nem tartalmazzák az abszolút várt szervi tömegeket a pozitív és negatív kontrollok esetében.

25. Mivel egy szövet relatív szórása inverz kapcsolatban áll a statisztikai erővel, a Hershberger bioassay teljesítménykritériumai az egyes szövetek maximális relatív szórásán alapulnak (1. táblázat). A relatív szórások az OECD validálási vizsgálatokból származnak. Negatív kimenetelek esetében a laboratóriumnak meg kell vizsgálnia a kontrollcsoport és a nagy dózisú kezelési csoport relatív szórását annak meghatározására, hogy a maximális relatív szórásra vonatkozó követelményt túllépték-e.

26. A tanulmányt meg kell ismételni, ha: 1) a kontrollcsoportban és a nagy dózisú kezelési csoportokban a tíz lehetséges egyedi relatív szórás közül három vagy több meghaladja az agonista és antagonista vizsgálatokhoz az 1. táblázatban megadott maximumokat, és 2) legalább két célszövet marginálisan inszignifikáns volt, azaz a r értékek 0,05 és 0,10 között voltak.

1. táblázat

Az OECD validálási vizsgálatokban a kasztrációs modell járulékos ivarszervi célszövetei részére meghatározott legnagyobb megengedett relatív szórások ([1])

Szövet	Antiandrogén hatás	Androgén hatás
Ondóhólyagok	40 %	40 %
Ventrális prosztata	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Cowper-mirigyek	35 %	55 %
Glans penis	17 %	22 %

([1]) Adott szövet relatív szórásának küszöbértékét a validálási program adott (agonista vagy antagonista) modellt használó összes kísérletének átlagértékeihez kapcsolódó – a legkisebbtől a legnagyobbig sorba rendezett – relatív szórások grafikonjából határozták meg. A relatív szórás küszöbértéket annál a pontnál olvasták le, ahol a sorozat következő legmagasabb relatív szórásához szükséges emelkedés drámaian nagyobb volt, mint az előző néhány relatív szórásnál – a „töréspont”. Meg kell jegyezni, hogy bár ez az elemzés viszonylag megbízható „töréspontokat” azonosított a vizsgálat antagonista modelljéhez, az agonista vizsgálat során nyert relatív szórások görbéi sokkal egyenletesebb növekedést mutattak, ami a relatív szórás küszöbértékének e módszerrel történő azonosítását némileg önkényessé teszi.

▼M5

ELJÁRÁS

Jogszabályi megfelelőség és a laboratórium vizsgálata

27. Az uterotrofikus vizsgálattal ellentétben (e melléklet B.54. fejezete) a Hershberger vizsgálat esetében a laboratórium jártasságát a vizsgálat megkezdése előtt nem kell igazolni, mert a vizsgálat szerves részeként egyidejűleg pozitív (tesztoszteron-propionát és flutamid) és negatív kontrollok is futnak.

Az állatok száma és állapota

28. Minden kezelési és kontrollcsoportnak minimum 6 állatot kell tartalmaznia. Ez az androgén és az antiandrogén protokollokra is vonatkozik.

Ivartalanítás

29. Az állatok érkezésekor először több napos akklimatizációs időszakot kell biztosítani, hogy az állatok egészségesek és életerősek legyenek. Mivel a 42 napos kor vagy a 42. posztnatális nap (PND) előtt kasztrált állatoknál még nem szükségszerűen mutatkozik a fitymaelválás, az állatokat a 42. posztnatális napon vagy azután kell ivartalanítani, nem előtte. Az állatokat altatásban ivartalanítjuk oly módon, hogy egy metszést ejtünk a herezacskón, majd mindkét herét és mellékherét eltávolítjuk az erek és a spermavezetékek lekötésével. Miután meggyőződtünk arról, hogy vérzés nem lépett fel, a herezacskót varrattal vagy kapcsokkal kell zárni. A műtét utáni első néhány napban az állatokat fájdalomcsillapítóval kell kezelni a műtét utáni kellemetlen érzést enyhítése érdekében. Ha a szállítótól ivartalanított állatokat vásároltunk, az állatok életkorát és a szexuális érettség fázisát a szállítónak kell garantálnia.

Ivartalanítás utáni akklimatizáció

30. Az állatoknak a kasztrálás után legalább 7 napig folytatniuk kell a laboratóriumi körülményekhez való akklimatizációt, hogy lehetővé váljon a célszövetek tömegének regressziója. Az állatokat naponta meg kell vizsgálni és a betegség vagy fizikai rendellenesség tüneteit mutató állatokat el kell távolítani. Így a kezelést az adagolás (vizsgált anyag) megkezdésével már PND 49 napos korban el lehet kezdeni, de nem később, mint PND 60. A boncoláskori életkor nem lehet nagyobb, mint PND 70. Ez a rugalmasság lehetővé teszi a laboratórium számára, hogy hatékony menetrendet alakítson ki a kísérleti feladatok elvégzéséhez.

A testtömeg és a csoportokba randomizálás

31. Az egyedi testtömegek közötti különbségek az állatcsoportokon belül és a csoportok között is eltéréseket eredményeznek a szövetek tömegében. A szöveti tömeg variabilitásának növekedése megnövekedett relatív szórást eredményez és csökkenti a vizsgálat statisztikai erejét (ezt nevezik néha vizsgálati érzékenységnek). Ezért a testtömeg eltéréseit kísérletileg és statisztikailag is kontrollálni kell.

32. A kísérleti szabályozás kis testtömeg-eltérések előállítását jelenti a vizsgálati csoporton belül és a csoportok között. Először is, a szokatlanul kicsi vagy nagy állatokat kerülni kell, az ilyenek nem kerülhetnek be a vizsgálati állományba. A vizsgálat megkezdésekor a felhasznált állatok tömegének variabilitása nem haladhatja meg az átlagos testtömeg ± 20 %-át (pl. 175 g ± 35 g peripubertális kasztrált patkányok esetében). Másodszor, az állatokat a randomizált súlyeloszlás módszerével kell besorolni a csoportokba (mind a kontroll-, mind a kezelési csoportokba), hogy az egyes csoportok átlagos testtömege statisztikailag ne különbözzön a többi csoportétól. Az alkalmazott blokkrandomizálási eljárást fel kell jegyezni.

▼M5

33. Mivel a toxicitás csökkentheti a kezelési csoportok testtömegét a kontrollcsoporthoz viszonyítva, a vizsgált vegyi anyag adagolásának első napján mért testtömeget lehet statisztikai kovariánsként használni a boncoláskor mért testtömeg helyett.

Adagolás

34. Annak megállapítása érdekében, hogy a vizsgált vegyi anyag rendelkezik-e *in vivo* androgénszerű hatással, két dóziscsoport plusz egy pozitív és egy vivőanyag (negatív) kontrollcsoport (lásd a 43. bekezdést) általában elegendő, ezért állatjólléti okok miatt ezt az elrendezést előnyben részesítik. Amennyiben a cél a dózis-válasz görbe felállítása vagy az alacsonyabb dózisokra történő extrapoláció, akkor legalább 3 dóziscsoportra van szükség. Ha az androgénaktivitás azonosításán túlmenő információra van szükség (például a hatóérték becslésére), eltérő adagolási rend alkalmazását kell megfontolni. Antiandrogének tesztelése esetén a vizsgált vegyi anyagot referencia androgén agonistával együtt adjuk be. Legalább 3, a vizsgált vegyi anyag különböző dózisaival kezelt vizsgálati csoportot, valamint egy pozitív és egy negatív kontrollcsoportot (lásd a 44. bekezdést) kell használni. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgált vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Ha a vizsgált vegyi anyag beadásához vivőanyagot alkalmazunk, a kontrollcsoportnak a vivőanyagból a kezelési csoportokban használt legnagyobb mennyiséget kell kapnia.

35. Valamennyi adagolási szint ajánlásánál és kiválasztásánál figyelembe kell venni a vizsgált, vagy az azzal rokon vegyi anyagok toxicitására és (toxiko)kinetikájára vonatkozóan rendelkezésre álló adatokat. A legnagyobb adag esetében először az LD50 és/vagy az akut toxicitási információkat kell figyelembe venni az állatok elhullásának, illetve súlyos szenvedésének vagy szorongásának elkerülése érdekében (17) (18) (19) (20), másrészt figyelembe kell venni a szubkrónikus és krónikus vizsgálatokban használt dózisokra vonatkozó információkat. Általánosságban, a legmagasabb dózis nem idézheti elő az állatok testtömegének a kontroll testtömeg 10 %-ánál nagyobb mértékű csökkentését. A legmagasabb dózis vagy 1) az a legmagasabb dózis, amely biztosítja az állatok túlélését és amely 10 egymást követő napon maximum 1 000 mg/kg/nap dózisban beadva nem okoz jelentős toxicitást vagy szorongást az állatoknak (lásd a 36. bekezdést) vagy – ha ez az alacsonyabb – 2) az (anti)androgén hatást kiváltó dózis. Szűrésként a dózisok közötti nagy intervallumok is elfogadhatók, pl. fél log egység, amely 3,2 dózisprogressziónak felel meg, vagy akár egy log egység is. Ha nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok, akkor dózisbehatárolóvizsgálatot (lásd a 37. bekezdést) lehet végezni az alkalmazandó dózisok meghatározása céljából.

Határdózis

36. Ha az 1 000 mg/testtömeg kg/nap határdózis és egy alacsonyabb dózis az ebben a vizsgálatban leírt eljárások alkalmazása mellett nem idéz elő statisztikailag szignifikáns változást a reproduktív szervek tömegében, akkor a további dózisszintek feleslegesnek tekinthetők. A határdózis alkalmazandó, kivéve, ha az emberi expozícióra vonatkozó adatok ennél nagyobb adagolási szint használatát indokolják.

A dózisbehatárolás szempontjai

37. Ha szükséges, néhány állattal előzetes dózisbehatároló vizsgálatot lehet végezni a megfelelő dóziscsoportok kiválasztásához [az akut toxicitási vizsgálat módszereit használva (e melléklet B.1.a. és B.1.b. fejezete (27), OECD TG 425 (19))]. A Hershberger bioassay esetében a cél olyan dózisok kiválasztása, amelyek biztosítják az állatok túlélését és amelyek nem okoznak jelentős toxicitást vagy szorongást az állatoknak a vegyi anyag tíz egymást követő napon legfeljebb 1000 mg/kg/nap határdózisban történő adagolása alatt, a 35. és 36. bekezdésben megadottak szerint. Ebben a tekintetben az

▼M5

OECD iránymutatását (25) lehet használni, amely meghatározza az állatokban jelentkező toxicitásra vagy szorongásra utaló klinikai tüneteket. Ha a tíznapos adagolással járó dózisbehatároló vizsgálatban megvalósítható, a célszöveteket körülbelül 24 órával az utolsó dózis adagolása után lehet kimetszeni és megmérni. Ezeket az adatokat azután arra lehet használni, hogy segítsék a dózisok kiválasztását a fő vizsgálatban.

Referencia vegyi anyagok és vivőanyag

38. A referencia androgén agonista a tesztoszteron-propionát (TP) kell legyen, CAS-szám: 57-82-5. A referencia TP-dózis 0,2 mg/testtömeg kg/nap vagy 0,4 mg/testtömeg kg/nap lehet. A referencia androgén antagonista a flutamid (FT) kell legyen, CAS-szám: 1311-84-7. A referencia FT-adag 3 mg/testtömeg kg/nap kell legyen és az FT-t a referencia TP adagolásával együtt kell alkalmazni.

39. Ahol csak lehetséges, először valamilyen vizes oldat/szuszpenzió használatát kell megfontolni. De mivel számos androgén ligandum vagy azok metabolikus prekurzorai hidrofóbok, a leggyakoribb megközelítés az, hogy olajos oldatot/szuszpenziót használnak (pl. kukorica-, mogyoró-, szezám- vagy olívaolaj). A vizsgált vegyi anyagokat fel lehet oldani minimális mennyiségű 95 %-os etanolban vagy más megfelelő oldószerben, majd a vizsgálati vivőanyaggal felhígítani a végső munkakoncentrációra. Az oldószer toxikus jellemzőit ismerni kell, és le is kell tesztelni egy külön csak oldószert tartalmazó kontrollcsoportban. Ha a vizsgált anyag stabilnak tekinthető, enyhe melegítést és erőteljes mechanikai hatást is lehet használni a vizsgált vegyi anyag feloldása során. Meg kell határozni azt is, hogy a vizsgált vegyi anyag mennyire stabil az adott vivőanyagban. Ha a vizsgált vegyi anyag stabil marad a vizsgálat időtartama alatt, akkor elő lehet állítani a vizsgált vegyi anyag kiindulási aliquotját, és a meghatározott adagolási hígításokat naponta el lehet készíteni, gondosan ügyelve arra, hogy elkerüljük a minták szennyeződését és állagromlását.

A dózisok beadása

40. A TP-t szubkután injekció formájában, az FT-t gyomorszondán át kell beadni.

41. A vizsgált vegyi anyagot orális szondán keresztül vagy szubkután injekció formájában adagoljuk. Az állatjóléti szempontokat és a vizsgálati vegyi anyag fizikai/kémiai tulajdonságait figyelembe kell venni a beadás módjának kiválasztásakor. Ezenkívül a toxikológiai szempontokat, mint például a vegyi anyaggal való emberi expozíciós úttal kapcsolatos relevanciát (pl. gyomorszonda a lenyelés modellezésére, bőr alá adott injekció a belégzés vagy bőrön át történő adszorpció modellezésére) és az anyagcserével és a kinetikával kapcsolatban rendelkezésre álló toxikológiai információkat és adatokat (pl. first pass metabolizmus elkerülése, jobb hatásfok adott útvonalon keresztül) egyaránt figyelembe kell venni, mielőtt kiterjedt, hosszú távú tesztelést kezdeményeznénk, ha az injekciós adagolás pozitív eredményt adott.

42. Az állatokat azonos módon és tíz egymást követő napon át körülbelül 24 órás időközönként kell kezelni. Az adagolási szintet naponta be kell állítani az egyidőben történő napi testtömeg-mérések alapján. Az adag térfogatát és az adagolás időpontját az expozíció minden napján fel kell jegyezni. Ügyelni kell arra, hogy az adatok értelmezhetősége érdekében ne lépjük túl a 35. bekezdésben megadott maximális dózist. A testtömeg csökkenését, a klinikai tüneteket és az egyéb megfigyeléseket alaposan meg kell vizsgálni ebből a szempontból. Az orális gyomorszondázáshoz gyomorszondát vagy megfelelő intubációs kanült kell használni. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. A állatgondozásra vonatkozó helyi iránymutatásokat be kell tartani, de a volumen nem

▼M5

haladhatja meg az 5 ml/testtömeg kg értéket, kivéve a vizes oldatok esetében, ahol 10 ml/testtömeg kg volument lehet használni. A szubkután injekció esetében a dózisokat a dorsoscapuláris és/vagy a lumbális régióba kell beadni steril (pl. 23-as vagy 25-ös méretű) tűvel és tuberkulin fecskendővel. Az injekció beadásának helyén a borotválás nem kötelező. Minden veszteséget, a beadás helyén történt szivárgást vagy nem teljes adagolást fel kell jegyezni. A patkányonként naponta injektált anyag teljes térfogata nem haladhatja meg a 0,5 ml/testtömeg kg mennyiséget.

Az androgén agonistákra vonatkozó különleges eljárások

43. Az androgén agonisták tesztelése esetében a vivőanyag a negatív kontroll, a TP-vel kezelt csoport pedig a pozitív kontroll. Az androgén agonistáknak megfelelő biológiai aktivitást egy vegyi anyag beadásával teszteljük, amelyet 10 egymást követő napon át kell adni a kezelési csoportoknak a kiválasztott dózisokban. A vizsgált vegyi anyag csoportokban lévő állatok öt járulékos ivarszervi szövetének tömegét összehasonlítjuk a vivőanyag csoportéval a statisztikailag szignifikáns tömegnövekedés kimutatása céljából.

Az androgén antagonistákra és 5α-reduktáz inhibitorokra vonatkozó különleges eljárások

44. Az androgén antagonisták és az 5α-reduktáz inhibitorok tesztelése esetében a TP-kezelt csoport a negatív kontroll, az FT és TP referencia dózisaival együttesen kezelt csoport pedig a pozitív kontroll. Az androgén antagonistáknak és 5α-reduktáz inhibitoroknak megfelelő biológiai aktivitást a TP referencia dózisának és a vizsgált anyagnak 10 egymást követő napon át történő beadásával tesztelik. A TP plusz vizsgált vegyi anyag csoportokban lévő állatok öt járulékos ivarszervi szövetének tömegét összehasonlítják a csak referencia TP-t kapó csoportéval a statisztikailag szignifikáns tömegcsökkenés kimutatása céljából.

MEGFIGYELÉSEK

Klinikai megfigyelések

45. Általános klinikai megfigyeléseket legalább naponta kell végezni, vagy gyakrabban, ha toxicitás jelei figyelhetők meg. A megfigyeléseket lehetőleg minden nap ugyanabban az időpontban vagy időpontokban kell végezni, figyelembe véve az adagolást követően várható hatások csúcsidőszakait. Valamennyi állatot meg kell figyelni a mortalitás és morbiditás előfordulására, valamint az általános klinikai tünetekre, mint például a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapota, a váladékok és kiválasztott anyagok előfordulása, valamint az autonóm aktivitás (például könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupillaméret, szokatlan légzési ritmusok) tekintetében megfigyelhető változásokra.

46. Az elhullott állatokat adatelemzés nélkül kell eltávolítani és ártalmatlanítani. Az állatok boncolás előtti bármilyen mortalitását fel kell jegyezni, együtt a mortalitás nyilvánvaló okával. A moribund állatokat humánus módon el kell pusztítani. A moribund állapotú, majd elpusztított állatokat bele kell venni a vizsgálati jegyzőkönyvbe a morbiditás nyilvánvaló okával együtt.

▼M5

Testtömeg és takarmányfogyasztás

47. Minden állatot naponta meg kell mérni 0,1 gramm pontossággal, közvetlenül a kezelés megkezdése előtt, azaz amikor az állatokat beosztják a csoportokba. Opcionális mérésként a kezelési időszak alatt elfogyasztott takarmány mennyiségét is meg lehet mérni a takarmányadagolók súlyának ketrecenkénti megmérésével. A takarmányfogyasztási eredményeket gramm/patkány/nap értékben kell megadni.

A szövetek és szervek boncolása és tömegének mérése

48. Körülbelül 24 órával a vizsgált anyag utolsó beadását követően a patkányokat el kell altatni és ki kell véreztetni a vizsgálatot végző laboratórium normál eljárása szerint, majd boncolást kell végezni. A humánus elpusztításra használt módszert fel kell jegyezni a laboratóriumi jegyzőkönyvben.

49. Ideális esetben a csoportok közötti boncolási sorrend véletlenszerűen kerül meghatározásra, hogy el lehessen kerülni a kezelési csoportok közvetlenül felfelé vagy lefelé irányuló progresszióját, ami befolyásolhatná az adatokat. A boncoláskor tett megállapításokat, azaz a kóros elváltozásokat/látható léziókat fel kell jegyezni és jegyzőkönyvezni kell.

50. Az öt androgénfüggő szövet (VP, SV, LABC, COW, GP) tömegét meg kell mérni. Ezeket a szövetmintákat ki kell metszeni, gondosan el kell távolítani róluk a felesleges tapadó szöveteket és a zsírt, majd meg kell határozni azok friss (fixálatlan) tömegét. Minden szövetet különös gondossággal kell kezelni, hogy elkerüljük a folyadékveszteséget és a kiszáradást, amelyek jelentős hibákat és variabilitást okozhatnak a feljegyzett tömegek csökkentése révén. A szövetek közül több nagyon kicsi vagy nehezen boncolható lehet, és ez variabilitást eredményezhet. Ezért fontos, hogy a járulékos ivarszervi szövetek boncolását végző személyek ismerjék ezeknek a szöveteknek a standard boncolási eljárásait. A boncolás szabványos műveleti eljárásainak (standard operating procedure, SOP) kézikönyve beszerezhető az OECD-től (21). A SOP útmutató szerinti körültekintő képzés minimalizálja a variabilitás potenciális forrásait a vizsgálatban. Ideális esetben ugyanaz a kórboncnok legyen felelős egy adott szövet boncolásáért, hogy kiküszöbölhető legyen a személyek közötti különbség a szövetek feldolgozása során. Ha ez nem lehetséges, a boncolást úgy kell megtervezni, hogy az egyes kórboncnokok egy adott szövetet boncoljanak az összes kezelési csoportban, és ne egy kórboncnok boncoljon minden szövetet a kontrollcsoportban, miközben valaki más a felelős a kezelési csoportokért. Mindegyik járulékos ivarszervi szövetet leitatás nélkül kell megmérni 0,1 gramm pontossággal, majd a kapott értékeket minden állatnál fel kell jegyezni.

51. A szövetek közül több nagyon kicsi vagy nehezen boncolható lehet, és ez variabilitást eredményezhet. A korábbi vizsgálatok eltérő relatív szórásokat jeleztek, amelyek különbözőek lehetnek a laboratórium jártasságától függően. Néhány esetben nagy különbségeket figyeltek meg a szövetek, például a VP és COW abszolút tömegében, egy adott laboratóriumon belül is.

52. A máj, a páros vese és a páros mellékvese tömegének mérése választható. A szövetekről itt is el kell távolítani a rátapadó fasciát és zsírt. A májat meg kell mérni 0,1 gramm pontossággal és az eredményt fel kell jegyezni, a páros vesét és a páros mellékvesét meg kell mérni a 0,1 gramm pontossággal és az eredményt fel kell jegyezni. Amellett, hogy a májat, a vesét és a mellékveséket befolyásolják az androgének, ezek a szervek a szisztémás toxicitásnak is hasznos jelzői.

▼M5

53. A szérumluteinizáló hormon (LH), tüszőstimuláló hormon (FSH) és a tesztoszteron (T) szintjének mérése választható. A szérum T-szintek segítenek annak meghatározásában, hogy a vizsgált vegyi anyag kiváltja-e a tesztoszteron metabolizmusát a májban, csökkentve ezáltal a szérumban mérhető szintet. A T-adatok nélkül az ilyen hatás egy antiandrogén mechanizmuson keresztül megvalósuló hatásnak tűnhet. Az LH-szint információt szolgáltat egy antiandrogén azon képességéről, hogy a szervek tömegének csökkentése mellett befolyásolja a hipotalamusz-hipofízis funkciót is, ami a hosszú távú vizsgálatokban heredaganatot válthat ki. Az FSH hormon fontos szerepet játszik a spermatogenezisben. A szérum T4 és T3 szintén választható mérések, amelyek hasznos kiegészítő információt szolgáltathatnak a vegyi anyagok azon képességéről, hogy megzavarják a pajzsmirigyhormonok homeosztázisát. Ha hormonméréseket kell végezni, a patkányokat boncolás előtt anesztetizálni kell és vért kell venni szívpunkcióval, az érzéstelenítési módszert óvatosan megválasztva, hogy ne befolyásolja a hormonmérést. A szérum előkészítésének módszerét, a radioimmunoassay vagy egyéb mérési készletek forrását, az analitikai eljárásokat és az eredményeket fel kell jegyezni. Az LH-szinteket ng/szérum ml mértékegységben kell jegyzőkönyvezni, a T-szinteket szintén.

54. A szövetek boncolását fotókkal kiegészített részletes boncolási útmutató formájában kiegészítő anyagként tették közzé a validálási program részeként (21). A boncolást bemutató videó is megtalálható a Korea Food and Drug Administration weblapján (22).

— Az állatot ventrális felületével felfelé fektetve határozzuk meg, hogy a pénisz fitymája elvált-e már a pénisz makkjától. Ha igen, akkor húzzuk vissza a fitymát és távolítsuk el a pénisz makkját, majd mérjük meg (0,1 mg pontossággal) és jegyezzük fel a tömegét.

— Nyissuk fel a hasi bőrt és a hasfalat, és tárjuk fel a zsigereket. Ha választható szerveket kell mérni, vegyük ki és mérjük meg a májat 0,1 g pontossággal, ezután távolítsuk el a gyomrot és a beleket, majd távolítsuk el és mérjük meg a páros veséket és a páros mellékveséket is 0,1 mg pontossággal. Ez a boncolási technika felfedi a húgyhólyagot és megkezdi a járulékos ivarszervi célszövetek boncolását.

— A VP boncolásához különítsük el a húgyhólyagot a ventrális izomrétegtől a kötőszövetnek a középvonal mentén történő átvágásával. Mozdítsuk el a húgyhólyagot anterior irányba az ondóhólyagok (SV) felé, felfedve a ventrális prosztata bal és jobb lebenyét (amelyeket zsírréteg fed). Óvatosan fejtsük fel a zsírt a VP jobb és bal lebenyéről. Óvatosan mozdítsuk el a VP jobb lebenyét a húgycsőről és metsszük le a lebenyt a húgycsőről. Miközben még mindig kézben tartjuk a VP jobb lebenyét, óvatosan mozdítsuk el a VP bal lebenyét a húgycsőről, majd metsszük le, ezután pedig mérjük le 0,1 mg pontossággal és jegyezzük fel a tömeget.

— Az ondóhólyagok és a koaguláló mirigyek (seminal vesicles plus coagulating glands, SVCG) boncolásakor mozdítsuk el a húgyhólyagot kaudális irányba, felfedve az ondóvezetéket és az ondóhólyag és a koaguláló mirigyek (SVCG) jobb és bal lebenyeit. A folyadék szivárgását érfogóval akadályozzuk meg az SVCG tövénél, ahol az ondóvezeték a húgycsőhöz csatlakozik. Óvatosan metsszük le az SVCG-t, majd az érfogót a helyén tartva távolítsuk el a zsírt és a kapcsolódó anatómiai képleteket, ezután pedig helyezzük lemért mérőtálkába, távolítsuk el az érfogót, mérjük le 0,1 mg pontossággal és jegyezzük fel a tömeget.

▼M5

— A levator ani plusz bulbocavernosus izmok (levator ani plus bulbocavernosus muscles, LABC) boncolásakor fel kell tárni az izmokat és a pénisz bázisát. Az LA izmok körbeveszik a vastagbelet, míg az elülső LA és BC izmok a bulbus penishez kapcsolódnak. A bőrt, illetve a pénisz bázisa és a végbélnyílás anterior vége közötti perianális adnexumot távolítsuk el. A BC izmokat fokozatosan metsszük le a bulbus penisről és a szövetekről. A vastagbelet kettévágjuk és a teljes LABC-t kiboncoljuk és eltávolítjuk. Az LABC-t megtisztítjuk a zsírtól és adnexumtól, majd megmérjük 0,1 mg pontossággal és a tömeget feljegyezzük.

— Az LABC eltávolítása után a kerek Cowper- vagy bulbourethrális mirigyek (COW) láthatóvá válnak a bulbus penis alapjánál, attól kissé dorzálisan. Gondos boncolásra van szükség, hogy a folyadékszivárgás megelőzése érdekében elkerülhető legyen a vékony kapszula bemetszése. Mérjük meg a páros COW-t 0,1 mg pontossággal és jegyezzük fel a tömeget.

— Ezenkívül, ha bármely mirigyből folyadékvesztés történik a boncolás és kimetszés során, azt fel kell jegyezni.

55. Ha a vegyi anyag értékelése az ésszerűnél több állat felboncolását igényli egyetlen napon belül, a vizsgálat kezdetét szét lehet osztani két egymást követő napra, ami a boncolás és a kapcsolódó munkák két napra történő szétosztását is eredményezi. A vizsgálat ilyen módon való elosztása esetén kezelési csoportonként csak az állatok egyik felét kell használni naponta.

56. A tetemeket a boncolást követően megfelelő módon meg kell semmisíteni.

JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

57. Az adatokat egyedenként (pl. testtömeg, járulékos ivarszervi szövetek tömege, választható mérések, egyéb válaszok és megfigyeléseik) vagy állatcsoportonként (az összes mérési átlagai és szórása) kell jegyzőkönyvezni. Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni. Az adatoknak tartalmazniuk kell az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a vizsgálat alatt elhullott vagy toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, beleértve a fellépés időpontját, időtartamát és súlyosságát.

58. A záró jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell:

Vizsgáló intézmény

— létesítmény neve, helye,

— vizsgálatvezető és egyéb személyzet, valamint a vizsgálattal kapcsolatos felelősségi körök,

— a vizsgálat kezdetének és végének időpontja, vagyis a vizsgált vegyi anyag adagolásának első napja és a boncolás utolsó napja.

Vizsgált vegyi anyag

— beszerzési forrás, tételszám, azonosítás, tisztaság, szállító teljes címe, vizsgált vegyi anyag(ok) jellemzése,

— fizikai jelleg és adott esetben a fizikai és kémiai tulajdonságok,

— tárolási körülmények és a hígítás készítésének módja és gyakorisága,

— a stabilitással kapcsolatban kapott adatok,

— az adagoló oldatok/szuszpenziók analízisei.

▼**M5**

Vivőanyag

— a vivőanyag jellemzői (azonosítás, szállító és tételszám),

— a választott vivőanyag indokolása (ha az nem víz).

Kísérleti állatok és állattenyésztési eljárások

— az alkalmazott faj/törzs és megválasztásuk indoklása,

— az állatok forrása vagy szállítója teljes címmel,

— a szállított állatok száma és életkora,

— tartási körülmények (hőmérséklet, megvilágítás stb.),

— takarmány (név, típus, szállító, tételszám, beltartalom, és ha ismert, a fitoösztrogének szintje),

— alom (név, típus, szállító, beltartalom),

— körülmények és az állatok száma a ketrecben.

A vizsgálat körülményei

— életkor a kasztráció időpontjában és az akklimatizáció időtartama a kasztrálás után,

— az egyes állatok testsúlya a vizsgálat kezdetekor (0,1 g pontossággal),

— a randomizáció folyamata és a vivőanyag, referencia, valamint a vizsgált vegyi anyag csoportokba és ketrecekbe való besorolás jegyzőkönyve,

— a testtömegek átlaga és szórása az egyes csoportban a vizsgálat valamennyi mérési napján,

— a dózis kiválasztásának indoka,

— a vizsgált vegyi anyag beadási módja és az expozíciós útvonal kiválasztásának indoklása,

— ha a vizsgálat antiandrogén hatás kimutatását célozza, a TP-kezelés (dózis és térfogat),

— a vizsgált vegyi anyaggal történt kezelés (dózis és térfogat),

— az adagolás időpontja,

— boncolási eljárások, ideértve a kivéreztetés és az érzéstelenítés eszközeit,

— ha szérumanalízist végeznek, a módszer részleteit meg kell adni. Például, ha RIA-t használnak, jegyzőkönyvezni kell a RIA eljárást, a RIA-készlet forrását, a készlet lejárati dátumait, a szcintillációs számlálási és a standardizálási eljárást.

Eredmények

— minden állat napi megfigyelése az adagolás során, egyebek mellett az alábbi szempontokból:

— testtömeg (0,1 g pontossággal),

— klinikai tünetek (ha vannak),

— a takarmányfogyasztásra vonatkozó bármely mérés vagy feljegyzés,

— boncolási megfigyelések állatonként, egyebek mellett:

▼M5

— a boncolás dátuma,

— a kezelési állatcsoport,

— az állat azonosítója,

— a kórbocnok,

— a boncolás és kimetszés időpontja,

— az állat kora,

— végső testtömeg a boncoláskor, bármilyen statisztikailag szignifikáns növekedés vagy csökkenés megadásával,

— az állat kivéreztetésének rendje és a boncolás során történő kimetszés rendje,

— az öt androgén-dependens célszövet tömege:

— ventrális prosztata (0,1 mg pontossággal),

— ondóhólyag és koaguláló mirigyek, beleértve a folyadékot (páros szervek, 0,1 mg pontossággal),

— levator ani plusz bulbocavernosus izom komplex (0,1 mg pontossággal),

— Cowper-mirigyek (friss tömeg – páros szerv, 0,1 mg pontossággal),

— glans penis (friss tömeg 0,1 mg pontossággal),

— választható szövetek tömege, ha ilyen is történt:

— máj (0,1 mg pontossággal),

— vese (páros szerv, 0,1 mg pontossággal),

— mellékvese (páros, 0,1 mg pontossággal),

— általános megjegyzések és észrevételek,

— szérum hormonok analízise, ha ilyen is történt,

  — szérum LH (választható – ng/szérum ml),

  — szérum T (választható – ng/szérum ml),

— általános megjegyzések és észrevételek.

Az adatok összegzése

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely tartalmazza a minta méretét az egyes csoportok esetén, az átlagos értéket és az átlag vagy a szórás standard hibáját. A táblázatoknak tartalmazniuk kell a boncoláskor mért testtömegeket, a testtömeg változását az adagolás kezdetétől a boncolásig, a cél járulékos ivarszervi szövetek tömegét és a választható szervek tömegét.

Az eredmények tárgyalása

Az eredmények elemzése

59. A test és a szervek boncoláskor mért tömegén – szükség esetén megfelelő adatátalakítással – statisztikai elemzést kell végezni különféle jellemzőkre, mint például a variancia homogenitására. A kezelési csoportokat össze kell hasonlítani a kontrollcsoporttal olyan technikák használatával, mint például az ANOVA, amelyet páros összehasonlításnak (pl. egyoldalú Dunnett-teszt) és a statisztikai különbség kritériumának kell követnie, például $p \leq 0,05$. Azonosítani kell a statisztikai szignifikanciát elérő csoportokat. A „relatív szerv” tömegeket azonban kerülni kell az ilyen adatmanipuláció alapjául szolgáló érvénytelen statisztikai feltételezések miatt.

▼**M5**

60. Androgén agonizmus esetén a kontrollnak a csak vivőanyagot kapó tesztcsoportnak kell lennie. A vizsgált vegyi anyag hatásmechanizmusának jellemzői eltérő relatív válaszokhoz vezethetnek a szövetek között, például a trenbolonnak, amelyet az 5-alfa-reduktáz nem alakít át, kifejezettebb hatása van a LABC-re és a GP-re, mint a TP-nek. Az öt androgénfüggő célszövet (VP, LABC, GP, CG és SVCG) közül bármelyik kettő vagy több tömegének statisztikailag szignifikáns növekedését ($p \leq 0,05$) pozitív androgén agonista eredménynek kell tekinteni, és valamennyi célszövetnek bizonyos mértékű fokozott növekedést kell mutatnia. A járulékos ivarszervek (accessory sex organs, ASO) szöveti válaszainak kombinált értékelését megfelelő sokváltozós adatelemzéssel lehet elvégezni. Ez javíthatja az elemzést, különösen azokban az esetekben, ahol csak egyetlen szövet ad statisztikailag szignifikáns választ.

61. Androgén antagonizmus esetében a kontrollnak a referencia androgénnel (csak tesztoszteron-propionát) kezelt csoportnak kell lennie. A vizsgált vegyi anyag hatásmechanizmusának jellemzői eltérő relatív válaszokhoz vezethetnek a szövetek között, például az 5-alfa-reduktáz inhibitoroknak, mint a finaszterid, kifejezettebb hatása van a ventrális prosztatára, mint egyéb szövetekre, összehasonlítva az erős AR antagonistákkal, mint amilyen például a flutamid. Az öt androgénfüggő célszövet (VP, LABC, GP, CG és SVCG) közül bármelyik kettő vagy több tömegének statisztikailag szignifikáns csökkenését ($p \leq 0,05$) a csak TP-kezeléssel összehasonlítva pozitív androgén antagonista eredménynek kell tekinteni, és valamennyi célszövetnek bizonyos mértékű csökkent növekedést kell mutatnia. Az ASO szöveti válaszok kombinált értékelését megfelelő sokváltozós adatelemzéssel lehet elvégezni. Ez javíthatja az elemzést, különösen azokban az esetekben, ahol csak egyetlen szövet ad statisztikailag szignifikáns választ.

62. Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely tartalmazza az átlagot, az átlag standard hibáját (a szórás is elfogadható) és az egyes csoportok mintaméretét. Az egyedi adattáblákat is bele kell foglalni a jegyzőkönyvbe. A kontrolladatok egyedi értékeit, átlagait, valamint az SE (szórás) értékeket és a relatív szórásokat meg kell vizsgálni annak eldöntése érdekében, hogy megfelelnek-e a várt történeti értékekkel való konzisztencia elfogadható kritériumainak. Az egyes szervek tömegének az 1. táblázatban (lásd a 25. és 26. bekezdést) szereplő relatív szórásait meghaladó relatív szórások meghatározzák, hogy vannak-e hibák az adatrögzítésben vagy -bevitelben, vagy hogy a laboratórium elsajátította-e az androgénfüggő szövetek pontos boncolási technikáját vagy indokolt a továbbképzés/gyakorlás. Általánosságban, a relatív szórások (szórás osztva az átlagos szervtömeggel) laborról laborra és vizsgálatról vizsgálatra reprodukálhatók. A bemutatott adatoknak tartalmazniuk kell legalább a ventrális prosztata, az ondóhólyag, a levator ani plusz bulbocavernosus izom, a Cowper-mirigyek, a glans penis és a máj tömegét és a testtömeget, valamint a testtömeg változását az adagolás megkezdésétől a boncolásig. Az adatokat a kovariancia testtömeggel való módosítása után is be lehet mutatni, de ez nem helyettesíti a kiigazítatlan adatok bemutatását. Ezenfelül, ha fitymaelválás (preputial separation, PPS) nem fordul elő egyik csoportban sem, a PPS előfordulási gyakoriságát fel kell jegyezni és statisztikailag össze kell hasonlítani a kontrollcsoporttal a Fisher Exact teszt alkalmazásával.

▼**M5**

63. Amikor a számítógépes adatok bevitelének pontosságát az eredeti adatlapokkal való összevetés alapján ellenőrzik, a biológiailag nem hihető vagy a kezelési csoport átlagától több mint három szórással eltérő szervtömeg-értékeket gondosan meg kell vizsgálni és el lehet vetni, mivel valószínűleg adatrögzítési hibák.

64. A vizsgálati eredmények összehasonlítása az OECD relatív szórásaival (1. táblázat) gyakran fontos értelmezési lépés a vizsgálati eredmények érvényessége tekintetében. A vivőanyag kontrollcsoportra vonatkozó történeti adatokat meg kell őrizni a laboratóriumban. A pozitív referencia vegyi anyagokra (mint például a TP és az FT) adott válaszokkal kapcsolatos történeti adatokat is meg kell őrizni a laboratóriumban. A laboratóriumok is rendszeresen ellenőrizhetik az ismert gyenge androgén agonistákra és antagonistákra adott választ és megőrizhetik ezeket az adatokat. Ezeket az adatokat össze lehet hasonlítani a rendelkezésre álló OECD-adatokkal annak biztosítása érdekében, hogy a laboratórium módszerei megfelelő statisztikai pontosságot és teljesítményt eredményezzenek.

▼**M5**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Androgén: fogalom, amelyet az androgén-dependens szövetekre gyakorolt pozitív hatás leírására használnak.

Antiandrogén: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a TP hatását gátolja.

Vegyi anyag: egy anyag vagy keverék.

Születés napja: a 0. posztnatális nap.

Dózis: a vizsgált vegyi anyag beadott mennyisége. A Hershberger bioassay esetében a dózist a vizsgált vegyi anyag tömegének és a kísérleti állat egységnyi testtömegének napi hányadosaként (például mg/testtömeg kilogramm/nap) fejezzük ki.

Adagolás: általános fogalom, amely a dózist, valamint az adagolás gyakoriságát és időtartamát foglalja magában.

Moribund: kifejezés, amelyet a haldokló, elhullás-közeli állapotban lévő állatok leírására használunk.

X. posztnatális nap: az élet X. napja a születés napját követően.

Érzékenység: a vizsgálati módszer azon képessége, hogy helyesen azonosítja be azokat a vegyi anyagokat, amelyek rendelkeznek a vizsgált tulajdonsággal.

Specificitás: a vizsgálati módszer azon képessége, hogy pontosan azonosítja be azokat a vegyi anyagokat, amelyek nem rendelkeznek a vizsgált tulajdonsággal.

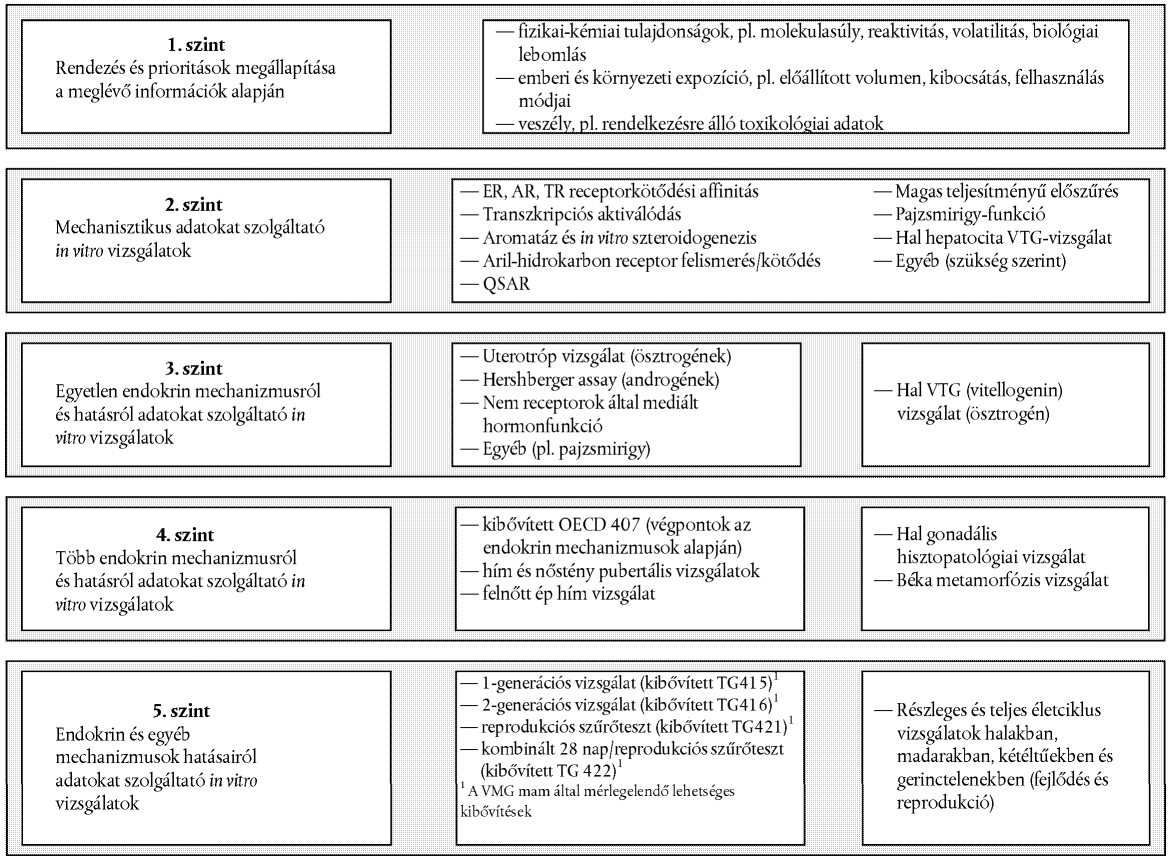
Vizsgált vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Validáció: tudományos folyamat, melynek célja egy adott vizsgálati módszer működési követelményeinek és korlátjainak jellemzése, valamint megbízhatóságának és egy adott célhoz kapcsolódó relevanciájának igazolása.

2. függelék

Megjegyzés: A Test Guidelines Programme titkársága általaz EDTA Task Force 6. Ülésén elért megállapodás alapján készített dokumentum

Az OECD fogalmi kerete az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok tesztelésére és értékelésére



VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment

▼**M5**

Megjegyzések a keretrendszerhez

1. megjegyzés: A belépés és kilépés minden szinten lehetséges és a veszély- és kockázatértékelésre szolgáló információs igények jellegétől függ

2. megjegyzés: Az 5-ös szinten az ökotoxikológiának olyan végpontokat is tartalmaznia kell, amelyek jelzik a káros hatások és a potenciális populációs károk mechanizmusait

3. megjegyzés: Amikor egy multimodális modell több egyetlen végpontú vizsgálatot lefed, ez a modell az egyetlen végpontú vizsgálatok helyébe lép

4. megjegyzés: Az egyes vegyi anyagokat eseti alapon kell értékelni, figyelembe véve az összes rendelkezésre álló információt és szem előtt tartva a keretrendszer különböző szintjeinek funkcióját.

5. megjegyzés: A keretrendszert jelenleg nem lehet mindenre kiterjedőnek tekinteni. A 3., 4. és 5. szinten olyan vizsgálatokat foglal magában, amelyek már rendelkezésre állnak vagy amelyek validálása még folyamatban van. Ami az utóbbiakat illeti, ezeket a keretrendszer ideiglenes jelleggel tartalmazza. Miután kifejlesztették és validálták ezeket, hivatalosan is bekerülnek a keretrendszerbe.

6. megjegyzés: Az 5. szintet nem lehet úgy tekinteni, hogy csak végleges teszteket tartalmaz. Az ezen a szinten szerepelő teszteket úgy tekintik, hogy hozzájáruljanak az általános veszély- és kockázatértékeléshez.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10^{th}-11^{th} March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

(3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and anti-androgenic 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, Paris.

(19) OECD (2008). Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf.

(22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html.

(23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.

(24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

(25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼**M5**

(26) Az Európai Parlament és a Tanács 2010. szeptember 22-i 2010/63/EU irányelve a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről (HL L 276., 2010.10.20., 33. o.).

(27) E melléklet következő fejezetei:

B.1.a: Akut orális toxicitás – rögzített dózisú eljárás

B.1.b: Akut orális toxicitás – akut toxikus osztály módszer

▼M5

B.56. KIBŐVÍTETT EGYGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 443. vizsgálati iránymutatásában (2012) leírt módszerrel. A vizsgálati módszer a Nemzetközi Élettudományi Intézet (ILSI) Egészség- és Környezettudományi Intézete (HESI) mezőgazdasági vegybiztonsági technikai ellenőrző bizottságának (ACSA Technical Commitee) az F_1 életszakasz kibővített egygenerációs reprodukciós vizsgálatra vonatkozó javaslatán alapul, amely megjelent Cooper et al., 2006 közlésében (1). A vizsgálati tervben számos fejlesztést és pontosítást hajtottak végre a vizsgálat rugalmasabbá tétele és annak kihangsúlyozása érdekében, hogy a meglévő ismeretekből kell kiindulni, az életben tett megfigyeléseket pedig a vizsgálat irányítására és személyre szabására kell használni. Ez a vizsgálati módszer részletes leírást ad a kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat elvégzéséhez. A vizsgálati módszer az F_1-állatok három kohortját írja le:

1. kohort: a reprodukciós/fejlődési végpontokat értékeli; ezt a kohortot ki lehet bővíteni az F_2-generációval is,

2. kohort: a vegyianyag-expozíciónak a fejlődő idegrendszerre gyakorolt lehetséges hatását értékeli,

3. kohort: a vegyianyag-expozíciónak a fejlődő immunrendszerre gyakorolt lehetséges hatását értékeli.

2. A második generáció értékeléséről, és a fejlődési neurotoxicitási kohort és/vagy a fejlődési immunotoxicitási kohort kihagyásáról szóló döntésnek tükröznie kell az értékelt vegyi anyagról meglévő ismereteket, valamint a különböző szabályozó hatóságok igényeit. A vizsgálati módszer célja, hogy részletesen bemutassa, hogyan végezhető el a vizsgálat, és felvázolja, hogyan kell az egyes kohortokat értékelni.

3. A 2. generáció előállítására vonatkozó belső kiváltó tényezőkkel kapcsolatos döntési eljárást az OECD 117. iránymutatása (39) írja le a belső kiváltó tényezőket használó szabályozó hatóságok számára.

Kiindulási megfontolások és célkitűzések

4. A kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat fő célja, hogy értékelje azokat a speciális életszakaszokat, amelyekre nem terjednek ki az egyéb típusú toxicitási vizsgálatok, és tesztelje a pre- és posztnatális vegyianyag-expozíció eredményeként esetleg előforduló hatásokat. A reprodukciós végpontok esetében a tervek szerint – első lépésként és ha rendelkezésre áll – az ismételt dózisú vizsgálatokból (beleértve a reprodukciós toxicitási szűrővizsgálatokat, például OECD TG 422 (32)), vagy az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatását célzó rövid távú szűrővizsgálatokból (például uterotrofikus vizsgálat – B.54. vizsgálati módszer (36); Hershberger assay – B.55. vizsgálati módszer (37)) származó információt használjuk fel arra, hogy kimutassuk a hímek és nőstények szaporítószerveire gyakorolt hatásokat. Ez hímek esetében magában foglalja a spermatogenezist (herék kórszövettani vizsgálata), nőstények esetében pedig az ivari ciklust, a follikulusok számát/a petesejtek érését, valamint a petefészek integritását (kórszövettan). A kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat olyan reprodukciós végpontok tesztelésére használható, amelyhez a hímek és nőstények interakciójára, konceptussal rendelkező nőstényekre és utódokkal rendelkező nőstényekre van szükség, valamint az F_1-nemzedékre a szexuális érettségig (lásd az OECD 151. iránymutatását, amely támogatja ezt a vizsgálati módszert (40)).

▼M5

5. A vizsgálati módszer célja, hogy értékelje a vegyi anyagok pre- és posztnatális fejlődésre gyakorolt hatásait, valamint hogy részletesen értékelje a szisztémás toxicitást vemhes és szoptató nőstényekben, illetve a fiatal és felnőtt utódokban. A kulcsfontosságú fejlődési végpontoknak, mint például az utódok életképességének, az újszülöttek egészségi állapotának, a születéskori fejlettségi állapotnak, valamint a felnőttkorig tartó fizikai és funkcionális fejlődésnek a részletes vizsgálata várhatóan beazonosítja az utódokban a speciális célszerveket. A vizsgálat ezenkívül információkat nyújt a vizsgált vegyi anyagnak a felnőtt hím és nőstény szaporítórendszer integritására és teljesítményére gyakorolt hatásaival kapcsolatban és/vagy megerősíti ezeket az információkat. Különösen, de nem kizárólag, a következő paramétereket kell figyelembe venni: az ivarmirigyek funkciója, az ivari ciklus, a spermiumok érése a mellékherében, a párzási viselkedés, a fogamzás, a vemhesség, az ellés és a szoptatás. Továbbá, az ezekre a rendszerekre gyakorolt lehetséges hatásokat a fejlődési neurotoxicitási és fejlődési immunotoxicitási értékelésekből kapott információk jellemzik. Az ezekből a vizsgálatokból származó adatoknak lehetővé kell tennie a káros hatást nem okozó szintek (NOAEL-ek), a legkisebb megfigyelhető ártalmas hatást okozó szintek (LOAEL-ek) és/vagy a benchmark dózisok meghatározását a különböző végpontok esetében, és/vagy a korábbi ismételt dózisú vizsgálatokban kimutatott hatások jellemzésére kell használni ezeket az adatokat és/vagy támpontul kell szolgálniuk a későbbi vizsgálatokhoz.

6. A 1. ábrán látható a protokoll sémája. A vizsgálandó vegyi anyagot folyamatosan kell adagolni fokozatosan növekvő dózisokban hím és nőstény állatok több csoportjának. Ezt a szülői (P) generációt egy előre meghatározott párzás előtti időtartományban (a vizsgált vegyi anyagról rendelkezésre álló információ alapján kiválasztott időtartam, de legalább két hét) és a két hetes párzási időszakban kell kezelni. A P-hímeket tovább, legalább az F_1 elválasztásáig kezeljük. Ezeket a hímeket legalább 10 héten át kell kezelni. Hosszabb ideig is lehet, ha a reprodukciós hatások tisztázására van szükség. A P-nőstények kezelése folytatódik a vemhesség és a szoptatás alatt, egészen a vizsgálatnak az almok elválasztása után történő befejezéséig (azaz 8-10 hetes kezelés). Az F_1-utódok további kezelést kapnak a vizsgált vegyi anyaggal az elválasztástól a felnőtté válásig. Amennyiben a második generációt is értékelik (lásd OECD 117. iránymutatás (39)), az F_1-utódok kezelése az F_2 elválasztásáig, vagy a vizsgálat befejezéséig tovább folytatódik.

7. Minden állaton klinikai megfigyeléseket és kórbonctani vizsgálatokat kell végezni a toxicitás jeleinek kimutatása érdekében, és külön hangsúlyt kell fektetni a hím és női szaporítórendszer épségére és teljesítőképességére, valamint az utódok egészségére, növekedésére, fejlődésére és működésére. Elválasztáskor a kiválasztott utódokat besoroljuk az egyes alcsoportokba (1–3. kohort, lásd a 33. és 34. bekezdést és az 1. ábrát) a további vizsgálatok céljára, ideértve a nemi érést, a reproduktív szervek integritását és funkcióját, a neurológiai és viselkedési végpontokat és az immunfunkciót.

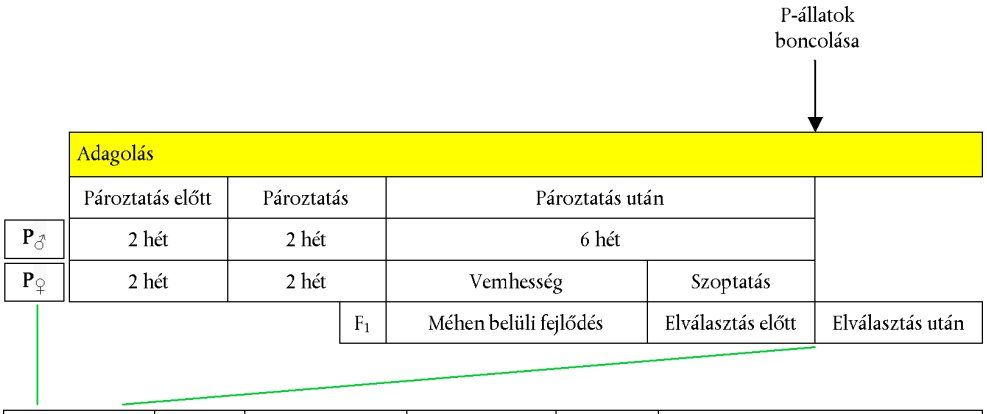
8. A vizsgálatok elvégzése során a klinikai tüneteknek, mint a biztonsági értékeléshez használt kísérleti állatok humánus végpontjainak felismeréséről, értékeléséről és használatáról szóló 19. OECD-iránymutatásban (34) ismertetett vezérelveket és szempontokat kell követni.

▼M5

9. Amikor elegendő számú vizsgálat áll rendelkezésre, hogy meggyőződjenek ennek az új vizsgálati elrendezésnek a hatásáról, a vizsgálati módszert felülvizsgálják, és ha szükséges, a szerzett tapasztalatok fényében módosítják.

1. ábra

A kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat sémája



Szülői generáció	Kohort	Cél	Állat/kohort	Nemi érés	Hozzávetőleges életkor boncoláskor (hét)
A cél 20 alom csoportonként	1A	Reprodukció	20 H + 20 N	Igen	13
	1B	Reprodukció	20 H + 20 N	Igen	14 vagy 20-25, ha szükségessé válik
	2A	Neurotoxicitás	10 H + 10 N @	Igen	11-12
	2B	Neurotoxicitás	10 H + 10 N @	Nem	3
	3	Immonutoxicitás	10 H + 10 N @	Igen	8
	Felesleg	Tartalék		Nem	3

@ Almonként egy, összességében reprezentatív a 20 alomra nézve, ha lehetséges

A MÓDSZER LEÍRÁSA/A VIZSGÁLAT ELŐKÉSZÜLETEI

Állatok

Az állatfaj és a törzs kiválasztása

10. A reprodukciós toxicitási vizsgálathoz használandó faj kiválasztását gondosan mérlegelni kell a rendelkezésre álló valamennyi információ fényében. A háttéradatok mennyisége és az általános toxicitási vizsgálatokkal való összehasonlíthatóság miatt azonban rendszerint a patkány az előnyben részesített állatfaj, és az ebben a vizsgálati módszerben megadott kritériumok és ajánlások is erre a fajra vonatkoznak. Ettől eltérő fajok alkalmazását megfelelően indokolni kell, és a protokoll megfelelő módosítására is szükség lesz. Nem szabad olyan törzseket alkalmazni, amelyek kevéssé termékenyek, vagy amelyekben magas a spontán fejlődési defektusok előfordulási gyakorisága.

Életkor, testtömeg és beválogatási kritériumok

11. Korábban vizsgálatban még részt nem vett, egészséges szülőállatokat kell használni. A hímeket és a nőstényeket egyaránt tanulmányozni kell, és a nőstényeknek nulliparának és nem vemhesnek kell lennie. A P-állatoknak szexuálisan érettnek, az adagolás kezdetén hasonló tömegűnek (azonos nemen belül), a párzáskor hasonló korúnak (kb. 90 nap) és a vizsgált faj és törzs reprezentatív példányainak kell lennie. Az állatoknak az érkezés után legalább 5 napig akklimatizálódniuk kell. Az állatokat véletlenszerűen soroljuk be a kontroll- és kezelt csoportokba, oly módon, ami hasonló átlagos testtömeg-értékeket eredményez a csoportok között (azaz a középérték ± 20 %-a).

▼M5

Tartási és etetési körülmények

12. A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérséklete 22 °C (± 3 °C) kell, hogy legyen. A relatív páratartalomnak 30–70 % között kell lennie, az ideális érték 50–60 % között van. A mesterséges világítást úgy kell beállítani, hogy 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Hagyományos laboratóriumi táplálás alkalmazható korlátozás nélküli ivóvízellátással. Különös figyelmet kell fordítani a takarmány fitoösztrogén-tartalmára, mivel a takarmány magas fitoösztrogén-szintje befolyásolhat egyes reprodukciós végpontokat. Szabványosított, nyitott receptúrájú takarmány használata ajánlott, amelyben csökkentették ösztrogénszerű vegyi anyagok mennyiségét (2) (30). A takarmány megválasztását a vizsgált vegyi anyaggal való megfelelő keveredés igénye is befolyásolhatja, ha a vizsgált vegyi anyagot a takarmánnyal adjuk be. Igazolni kell a vizsgált vegyi anyag arányát, homogenitását és stabilitását a takarmányban. Rendszeresen ellenőrizni kell, hogy a takarmány és az ivóvíz nem tartalmaz-e szennyező anyagokat. A vizsgálat során használt takarmány tételeiből vett mintákat megfelelő körülmények között (pl. – 20 °C-on fagyasztva) meg kell őrizni a jelentés véglegesítéséig arra az esetre, ha az eredmények takarmányösszetevők további elemzését teszik szükségessé.

13. Az állatokat ketrecben, azonos nemű és kezelési csoportba tartozó állatokból álló kis csoportokban kell tartani. Egyedileg is elhelyezhetők a sérülések elkerülése érdekében (pl. hímek a párzási időszak után). A párztatásokat erre a célra alkalmas ketrecekben kell végezni. Miután a párzás bizonyíthatóan megtörtént, a feltételezhetően vemhes nőstényeket különkülön kell elhelyezni fiaztató ketrecekben, ahol megfelelő és meghatározott fészekrakó anyagot kell biztosítani számukra. Az almoknak az anyaállattal kell maradniuk az elválasztásig. Az F_1-állatokat ketrecben, azonos nemű és kezelési csoportba tartozó állatokból álló kis csoportokban kell tartani az elválasztástól a vizsgálat befejezéséig. Ha tudományos szempontból indokolt, az állatokat egyedileg is el lehet helyezni. A kiválasztott alomanyag fitoösztrogének-szintjének minimálisnak kell lennie.

Az állatok száma és azonosítása

14. Normális esetben minden teszt- és kontrollcsoportnak elegendő számú pároztatandó állatpárt kell tartalmaznia, hogy az dóziscsoportonként legalább 20 vemhes nőstényt eredményezzen. A cél az, hogy megfelelő mennyiségű vemhességet hozzunk létre ahhoz, hogy felmérhessük a vegyi anyag hatását a termékenységre, a vemhességre és az anyai viselkedésre a P-nemzedékben, valamint a növekedésre és a fejlődésre az F_1-utódokban a fogamzástól az érettségig. Ha nem sikerül elérni a kívánt számú vemhes állatot, az nem feltétlenül érvényteleníti a vizsgálatot, hanem eseti elbírálás alapján kell kiértékelni, figyelembe véve a lehetséges ok-okozati összefüggést a vizsgált vegyi anyaggal.

15. Minden P-állatot egyedi azonosító számmal kell ellátni az adagolás megkezdése előtt. Ha a laboratóriumi történeti adatok azt mutatják, hogy a nőstények jelentős része esetleg nem fog szabályos (4 vagy 5 napos) ivari ciklust mutatni, akkor az ivari ciklusokat a kezelés megkezdése előtt javasolt kiértékelni. Alternatív megoldásként a csoport mérete is megnövelhető annak érdekében, hogy mindegyik csoportban legalább 20 nősténynek legyen szabályos (4 vagy 5 napos) ivari ciklusa a kezelés kezdetén. A születés utáni (PND) 0. vagy 1. napon, az újszülöttek első vizsgálata során minden F_1-utódot egyedi azonosítóval kell ellátni. A származási almot beazonosító feljegyzéseket minden F_1-állat esetében meg kell őrizni a vizsgálat egész időtartama alatt, adott esetben az F_2-állatok esetében is.

▼M5

Vizsgált vegyi anyag

A vizsgált vegyi anyagról rendelkezésre álló információk

16. A rendelkezésre álló információkat a beadási módra, a vivőanyag kiválasztására, az állatfaj kiválasztására, a dózisok kiválasztására és az adagolási ütemterv lehetséges módosítására vonatkozó döntések céljából felül kell vizsgálni. Ezért a vizsgált vegyi anyagról rendelkezésre álló valamennyi releváns információt, azaz a fizikai-kémiai, toxikokinetikai (beleértve a fajspecifikus anyagcserét) és toxikodinamikai tulajdonságokat, a szerkezet-hatás összefüggéseket (SAR), az *in vitro* anyagcsere folyamatokat, a korábbi toxicitási vizsgálatok eredményeit és a szerkezeti analógokra vonatkozó releváns információkat figyelembe kell venni a kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat tervezése során. A felszívódásra, eloszlásra, metabolizmusra és eliminációra (ADME) és a bioakkumulációra vonatkozó előzetes információk a kémiai szerkezetből, a fizikai-kémiai adatokból, a plazmafehérjékhez való kötődés mértékéből vagy a toxikokinetikai (TK) vizsgálatokból származhatnak, míg a toxicitási vizsgálatok eredményei kiegészítő információkat közölnek, például a NOAEL, az anyagcsere vagy a metabolizmus indukciója tekintetében.

A toxikokinetikai adatok figyelembevétele

17. Bár használatuk nem kötelező, a korábban elvégzett dózisbehatároló és egyéb vizsgálatok TK-adatai rendkívül hasznosak a vizsgálati elrendezés megtervezésében, az alkalmazott dózisok szintjének kiválasztásában és az eredmények kiértékelésében. Különösen hasznosak azok az adatok, amelyek: 1) igazolják a fejlődő magzatok és kölykök vizsgált anyaggal (vagy a metabolitjaival) történt expozícióját, 2) becslést adnak a belső dozimetriáról és 3) értékelik a kinetikai folyamatok potenciális dózisfüggő telítettségét. Amennyiben rendelkezésre állnak, további TK-adatokat is figyelembe kell venni, mint például a metabolit profilokat, koncentráció-idő görbét, stb. Kiegészítő TK-adatokat is lehet gyűjteni a fő vizsgálat során, feltéve, hogy az nem zavarja a fő vizsgálati végpontok gyűjtését és értelmezését.

Általános útmutatásként az alábbi TK-adathalmaz lehet hasznos a kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat tervezése során:

— terhesség késői szakasza (pl. vemhesség 20. napja) – anyai vér és magzati vér,

— szoptatás középső szakasza (PND 10) – anyai vér, kölyök vér és/vagy tej,

— korai elválasztás utáni szakasz (pl. PND 28) – elválasztott kölykök vérmintái.

Az egyes analitok (pl. szülő vegyi anyag és/vagy metabolitok) és a mintavételi rendszer meghatározása során rugalmasan kell eljárni. Például a mintavételek száma és időzítése egy adott mintavételi napon a beadási módtól, valamint a nem terhes állatokban mutatott TK-tulajdonságok előzetes ismeretétől fog függeni. Az étrendi vizsgálatok esetében elegendő a minden nap egyetlen konzisztens időpontban történő mintavétel, míg a gyomorszondán át történő adagolás további mintavételi időpontokat tehet szükségessé a különböző belső dózisok pontosabb becslése érdekében. Azonban egyik mintavételi napon sincs szükség a teljes koncentráció-időgörbe elkészítésére. Szükség esetén a vért az almon belül nemenként egyesíteni lehet a magzati és újszülöttkori analízisekhez.

▼M5

Az adagolás módja

18. Az adagolási mód kiválasztásánál az emberi expozíció szempontjából leginkább releváns útvonal(ak)at kell figyelembe venni. Bár a protokollt a vizsgált vegyi anyag takarmányon keresztül történő beadására tervezték, a vegyi anyag jellemzőitől és a szükséges információktól függően módosítható más beadási módra is (ivóvíz, gyomorszonda, belégzés, bőr).

A vivőanyag kiválasztása

19. A vizsgált vegyi anyagot szükség esetén alkalmas vivőanyagban feloldjuk vagy szuszpendáljuk. Lehetőség szerint elsősorban vizes oldatot/emulziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (például kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. A potenciális belső toxicitással rendelkező vivőanyagok használatát kerülni kell (pl. aceton, DMSO). Meg kell határozni azt is, hogy a vizsgált vegyi anyag mennyire stabil az adott vivőanyagban. Ha vivőanyagot vagy más adalékanyagot használunk az adagolás megkönnyítésére, a következő tulajdonságokat kell figyelembe venni: a vizsgált vegyi anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára vagy retenciójára gyakorolt hatások, a vizsgált vegyi anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt azon hatások, amelyek módosíthatják annak toxikus jellemzőit, valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások.

A dózis megválasztása

20. A vizsgálatnak alapesetben legalább három dózisszintet és egy párhuzamos kontrollt kell tartalmaznia. A megfelelő dózisok megválasztásakor a vizsgálatvezetőnek figyelembe kell vennie az összes rendelkezésre álló információt, beleértve a korábbi vizsgálatokból származó dózisinformációkat, a vemhes vagy nem vemhes állatok TK-adatait, a laktációs transzfer mértékét, valamint az emberi expozícióra vonatkozó becsléseket. Ha olyan TK-adatok állnak rendelkezésre, amelyek a TK-folyamatok dózisfüggő telítődését jelzik, ügyelni kell arra, hogy elkerüljék az olyan magas adagokat, amelyek egyértelműen telítődést mutatnak, feltéve természetesen, hogy az emberi expozíció várhatóan jóval a telítettségi pont alatt lesz. Ilyen esetekben a legmagasabb dózisszintnek a nemlineáris TK-viselkedésbe való átmenet inflexiós pontján vagy kicsivel felette kell lennie.

21. Az erre vonatkozó TK-adatok hiányában a dózisszinteknek a toxikus hatásokon kell alapulnia, kivéve, ha ezt a vizsgált vegyi anyag fizikai/kémiai jellege korlátozza. Ha a dózisok a toxicitáson alapulnak, a legmagasabb dózist úgy kell megválasztani, hogy valamilyen szisztémás toxicitást váltson ki, de ne okozza az állat halálát vagy súlyos szenvedését.

22. Fokozatosan csökkenő dózisszinteket kell választani annak érdekében, hogy demonstrálni lehessen a dózisfüggő hatásokat és a megfigyelhető káros hatást nem okozó szintet (NOAEL), illetve a kimutatási határ közelében lévő dózisokat, amelyek lehetővé teszik benchmark dózis meghatározását a legérzékenyebb végpontokra. A NOAEL-ek és LOAEL-ek közötti nagy dózistávolság elkerülése érdekében gyakran a két- vagy négyszeres intervallumok az optimálisak. Nagyon nagy dózisintervallumok (pl. 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazása helyett gyakran előnyösebb egy negyedik vizsgálati csoport beiktatása.

23. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgált vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Ez a csoport egy kezeletlen vagy placebóval kezelt kontrollcsoport, vagy ha a vizsgálandó anyag beadásához vivőanyagot használnak, akkor egy vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport. Vivőanyag alkalmazása esetén a kontrollcsoportban a legnagyobb alkalmazott mennyiségben kell beadni a vivőanyagot.

▼M5

Határdózis-vizsgálat

24. Amennyiben az ismételt dózisú vizsgálatokban nincs bizonyíték a toxicitásra legalább 1 000 mg/testtömeg kg/nap dózisban, vagy ha toxicitás nem várható a szerkezetileg és/vagy metabolikusan rokon vegyi anyagokra vonatkozó adatok alapján, amelyek az *in vivo/in vitro* metabolikus tulajdonságok hasonlóságát jelzik, a több dózisszintet használó vizsgálatra nem feltétlenül van szükség. Ilyen esetekben kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálatot lehet végezni kontrollcsoporttal és egyetlen, legalább 1 000 mg/testtömeg kg/nap dózissal. Ha azonban ezen a határdózison reprodukciós vagy fejlődési toxicitásra utaló bizonyíték található, további vizsgálatokra lesz szükség alacsonyabb dózisokkal a NOAEL beazonosítása céljából. Ezek a határdózis-vizsgálati szempontok csak akkor érvényesek, ha az emberi expozíció nem indikál magasabb dózist.

A KÍSÉRLET VÉGREHAJTÁSA

Az utódok expozíciója

25. Az adagolás preferált módja a takarmányban történő expozíció. Mesterséges táplálást alkalmazó vizsgálat végzése esetén figyelembe kell venni, hogy a kölykök általában mindaddig csak közvetve, az anyatejen keresztül kapják a vizsgált vegyi anyagot, amíg az elválasztáskor meg nem kezdődik a közvetlen adagolás. A táplálékkal vagy ivóvízzel történő adagolást alkalmazó vizsgálatok esetében a kölykök közvetlenül is megkapják a vizsgált vegyi anyagot, amikor a szoptatási időszak utolsó hetében önállóan is elkezdenek táplálkozni. Meg kell fontolni a vizsgálati terv módosítását, ha a vizsgált vegyi anyag gyengén választódik ki a tejben, valamint akkor, ha hiányzik a bizonyíték az utódok folyamatos expozíciójára. Ezekben az esetekben a rendelkezésre álló toxikokinetikai információk, az utódokban jelentkező toxicitás vagy a biológiai markerek változásai alapján meg kell fontolni az utódoknak a szoptatás alatti közvetlen adagolását (3) (4). A szoptatott kölykökön végzett közvetlen adagolásos vizsgálatok előtt gondosan mérlegelni kell az előnyöket és a hátrányokat (5).

Adagolási ütemterv és a dózisok beadása

26. Az ivari ciklusra, a férfi és a női ivarszervek kórszövettanára és a here/mellékhere spermaanalízisére vonatkozó egyes információk elérhetők a korábbi megfelelő időtartamú ismételt dózisú toxicitási vizsgálatokból. A kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálatban a párzás előtti kezelés időtartama ezért a funkcionális változásokra gyakorolt olyan hatások észlelését célozza, amelyek zavarhatják a párzási viselkedést és a megtermékenyítést. A párzás előtti kezelés legyen elég hosszú, hogy a P-hímeknél és -nőstényeknél elérjék az állandósult állapotú expozíciós körülményeket. A párosodás előtti 2 hetes kezelés a legtöbb esetben mindkét nemnél megfelelőnek tekinthető. A nőstények esetében ez 3–4 teljes ivari ciklust is magában foglal és elegendőnek kell lennie a ciklusra gyakorolt bármilyen káros hatás észleléséhez. Hímeknél ez megfelel az érlelődő spermiumok mellékhere-tranzitjához szükséges időnek, és lehetővé teszi a spermiumokra a here után (a spermiumképződés utolsó szakaszaiban és a spermiumok mellékherében zajló érése során) gyakorolt hatások észlelését. A vizsgálat befejezéséig, amikor a here és a mellékhere kórszövettani vizsgálata és a spermaparaméterek analízise tervezett, a P- és F_1-hímek legalább egy teljes spermiumképződési folyamaton át ki voltak téve a vizsgálat anyagnak ((6) (7) (8) (9) és OECD 151. iránymutatás (40)).

▼**M5**

27. A hímek párzás előtti expozíciós forgatókönyvét módosítani lehet, ha a heretoxicitást (a spermatogenesis károsodása) vagy a spermiumok integritására és funkciójára gyakorolt hatásokat a korábbi vizsgálatok már egyértelműen beazonosították. Hasonlóképpen, a nőstények esetében a vizsgált vegyi anyagnak az ivari ciklusra és így a szexuális fogékonyságra gyakorolt ismert hatásai eltérő párzás előtti expozíciós forgatókönyveket támaszthatnak alá. Különleges esetekben elfogadható lehet, hogy a P-nőstények kezelése csak azután indul, hogy spermium-pozitív kenetet sikerült venni (lásd a 151. OECD iránymutatást (40)).

28. Ha a párzás előtti adagolási időszakot meghatároztuk, az állatokat heti hét napon át folyamatosan kell a vizsgált vegyi anyaggal kezelni, egészen a boncolásig. Valamennyi állatot ugyanazon a módon kell kezelni. Az adagolást a kéthetes párzási időszak alatt is folytatni kell, P-nőstények esetében a vemhesség és a szoptatás alatt is, egészen az elválasztás utáni elaltatásig. A hímeket azonos módon kell kezelni az elaltatásig, amelyre az F_1-állatok elválasztásakor kerül sor. A boncolás tekintetében elsőbbséget kell adni azoknak a nőstényeknek, amelyeket a szoptatás ugyanazon/hasonló napján kell felboncolni. A hímek boncolása több napra is áthúzódhat a laboratórium lehetőségeitől függően. A kiválasztott F_1-hímek és nőstények közvetlen adagolását az elválasztáskor kell megkezdeni – kivéve abban az esetben, ha azt már a szoptatás alatt megkezdték – és a tervezett boncolásig folytatni, a kohort feladatától függően.

29. A takarmánnyal vagy ivóvízzel adagolt vegyi anyagok esetében fontos annak biztosítása, hogy a vizsgált vegyi anyag beadott mennyisége nem zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt vagy a vízháztartás egyensúlyát. Amennyiben a vizsgált vegyi anyagot a táplálékkal juttatják be, a táplálékbeli koncentrációt (ppm) vagy az állat testtömegére számított dózist kell állandó értéken tartani, és meg kell adni, hogy melyik alternatívát választottuk ki.

30. Ha a vizsgált vegyi anyagot szondán keresztül juttatják be, az egy időpontban beadott folyadék térfogata általában nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömeg értéket (0,4 ml/100 g testtömeg a maximum az olajok, pl. a kukoricaolaj esetében). Az irritáló vagy korróziót okozó vegyi anyagok kivételével, amelyek esetében a magasabb koncentrációk súlyosabb hatásokat okoznak, minimálisra kell csökkenteni a térfogatbeli eltéréseket, amihez a koncentrációt kell úgy beállítani, hogy minden dózisszinten állandó térfogatot lehessen biztosítani. A kezelésnek minden nap hasonló időpontban kell történnie. Az egyes állatoknak adott adagnak általában a legfrissebb egyedi testtömeg-mérésen kell alapulnia, és legalább hetente korrigálni kell a felnőtt hímek és a felnőtt, nem vemhes nőstények esetében, illetve minden második napon a vemhes nőstények és az F_1-állatok esetében, ha az adagolásra az elválasztás előtt és az elválasztás utáni 2 hétben kerül sor. Ha a TK-adatok azt mutatják, hogy a vizsgált vegyi anyag csak kis mértékben jut át a placentán, a vemhesség utolsó hetében mesterséges táplálással bejuttatott adagot esetleg módosítani kell, hogy megakadályozzuk az anyaállatokra túlságosan toxikus dózis beadását. A nőstények a fialás napján nem kezelhetők gyomorszondán keresztül vagy bármely egyéb olyan módon, amelynek során az állatokat meg kell fogni; előnyösebb kihagyni a vizsgált vegyi anyag adagolását a fialás napján, mint megzavarni az ellés folyamatát.

▼M5

Pároztatás

31. A P-nőstényeket egyetlen, véletlenszerűen kiválasztott, nem rokon, azonos dóziscsoportból származó hímmel kell elhelyezni (1:1 párosítás), amíg párosodásra utaló bizonyíték nem észlelhető vagy amíg 2 hét el nem telik. Amennyiben nincs elegendő hím, például a hím párosodás előtti elhullása miatt, akkor a hím(ek)et, amelyek már párosodtak, második nőstény(ek)kel is párosítani lehet (1:1), hogy minden nőstény pároztatva legyen. A vemhesség 0. napja definíció szerint az a nap, amikor a párosodás tényét megerősítették (hüvelydugó vagy ondó figyelhető meg a nőstényben). Az állatokat a lehető leghamarabb el kell különíteni, ha párosodás utáni bizonyíték figyelhető meg. Ha a párosodás 2 hét alatt nem történik meg, az állatokat el kell különíteni a párosodás minden további lehetősége nélkül. Az adatok között egyértelműen fel kell tüntetni a pároztatott párokat.

Az alom mérete

32. Az ellés utáni negyedik napon módosíthatjuk az egyes almok egyedszámát a létszám fölötti kölykök véletlenszerű eltávolításával, hogy az eredmény – amennyire lehetséges – almonként öt hím és öt nőstény utód legyen. A kölykök szelektív, pl. a testtömeg alapján történő eltávolítása nem elfogadható. Ha a hím és nőstény utódok száma nem teszi lehetővé a nemenként öt azonos nemű utódot tartalmazó almok kialakítását, részleges kiegyenlítés is elfogadható (például hat hím és négy nőstény).

A kölykök kiválasztása az elválasztás utáni vizsgálatokhoz (lásd az 1. ábrát)

33. Az elválasztáskor (kb. PND 21) az összes rendelkezésre álló alomból csoportonként legfeljebb 20 kölyköt beválogatunk a további vizsgálatokhoz a dóziscsoportokba és a kontrollcsoportba, és a nemi érésig tartjuk őket (kivéve, ha korábbi vizsgálatra van szükség). A kölyköket véletlenszerűen választjuk ki, azzal a kivétellel, hogy a nyilvánvalóan csökött utódokat (az állatok testtömege több mint két szórással alatta van az adott alom átlagos tömegének) nem kell figyelembe venni, mivel nem valószínű, hogy a kezelési csoport reprezentatív képviselői lesznek.

A 21. posztnatális napon a kiválasztott F_1-utódokat véletlenszerűen besoroljuk a három kohort egyikébe az alábbiak szerint:

1. kohort (1.A és 1.B) = Reprodukciós/fejlődési toxicitási vizsgálat,

2. kohort (2.A és 2.B) = Fejlődési neurotoxicitási vizsgálat,

3. kohort = fejlődési immunotoxicitási vizsgálat,

1.A kohort: Egy hím és egy nőstény/alom/csoport (20/nem/csoport): prioritást élvező kiválasztás a szaporítórendszerre gyakorolt hatások és az általános toxicitás elsődleges értékeléséhez.

1.B kohort: Egy hím és egy nőstény/alom/csoport (20/nem/csoport): prioritást élvező kiválasztás a szaporodási teljesítményének az F_1-állatok pároztatása útján történő nyomonkövetési értékeléséhez, amennyiben ezt is értékelik (lásd az OECD 117. iránymutatását (39)), valamint további kórszövettani adatok gyűjtéséhez reproduktív vagy endokrin toxikus anyagok gyanúja esetén, vagy ha az 1.A kohort eredményei kétesek.

2.A kohort: Csoportonként összesen 20 kölyköt (10 hímet és 10 nőstényt csoportonként, egy hímet vagy egy nőstényt almonként) sorolunk be idegrendszeri vizsgálatra, amelyet a felnőttek idegkórszövettani értékelése követ.

2.B kohort: Csoportonként összesen 20 kölyköt (10 hímet és 10 nőstényt csoportonként, egy hímet vagy egy nőstényt almonként) sorolunk be elválasztáskori idegkórszövettani értékelésre (PND 21 vagy PND 22). Ha nincs elegendő állat, akkor az állatok 2.A kohortba történő besorolását kell előnyben részesíteni.

▼M5

3. kohort: Csoportonként összesen 20 kölyök (10 hím és 10 nőstény csoportonként; almonként egy állat, ha lehetséges). További kölyökökre lehet szükség a kontrollcsoportból, hogy betöltsék a pozitív kontroll állatok szerepét a T-sejt függő antitest válasz vizsgálat (TDAR) során, amelyet PND 56 ± 3 kell elvégezni.

34. Ha nincs minden kohort kiszolgálásához elegendő számú kölyök egy alomban, az 1. kohort elsőbbséget élvez, hiszen azt ki lehet bővíteni, hogy egy F_2-generációt produkáljon. Különleges aggály esetén – például ha a vegyi anyag gyaníthatóan neuro-, immun- vagy reprodukciós toxicitást okoz – további kölyköket lehet rendelni bármelyik kohorthoz. Ezeket a kölyköket különböző időpontokban lehet vizsgálatokra vagy kiegészítő végpontok értékelésére használni. A kohortokba nem sorolt kölyköket klinikai biokémiai vizsgálatnak (55. bekezdés) és makroszkópos boncolásnak (68. bekezdés) vetjük alá.

A P állatok második pároztatása

35. A P-állatok második pároztatása általában nem ajánlott, hiszen az implantációs helyek számára vonatkozó fontos adatok elvesztéséhez vezet (és így a posztimplantációs és perinatális veszteségadatok elvesztéséhez, amelyek a lehetséges teratogén potenciál mutatói) az első alom esetében. A vegyi anyagnak kitett nőstényekre gyakorolt valamely hatás vizsgálatára vagy tisztázására vonatkozó igényt az szolgálja jobban, ha a vizsgálatot kibővítik, hogy magába foglalja az F_1-generáció pároztatását is. A P-hímek második pároztatása kezeletlen nőstényekkel azonban mindig egy lehetőség abban az esetben, ha kétes leleteket kell tisztázni, vagy ha az első pároztatás során olyan termékenységre gyakorolt hatást figyeltek meg, amelynek további jellemzésére van szükség.

MEGFIGYELÉSEK ÉLŐ ÁLLATBAN

Klinikai megfigyelések

36. A P- és a kiválasztott F_1-állatok esetében naponta egyszer általános klinikai megfigyelést kell végezni. Ha az adagolás gyomorszondán keresztül történik, a klinikai megfigyeléseket az adagolás előtti és utáni időpontra kell időzíteni (a csúcs plazmakoncentrációhoz társított toxicitás lehetséges jeleinek észlelése érdekében). A releváns viselkedésbeli változásokat, a nehéz vagy hosszan tartó ellés jeleit és a toxicitás minden tünetét rögzíteni kell a jegyzőkönyvben. Az állatokat naponta kétszer, illetve hétvégeken naponta egyszer meg kell vizsgálni súlyos toxicitás, megbetegedés és elhullás szempontjából.

37. Ezenkívül az összes P- és F_1-állatot (elválasztás után) heti rendszerességgel részletesen meg kell vizsgálni, ami kényelmesen elvégezhető az állat mérésekor, minimálisra csökkentve a kezeléssel járó stresszt. A megfigyeléseket gondosan kell végezni és a vizsgálati laboratórium által meghatározott pontozásos rendszerek segítségével kell rögzíteni. Törekedni kell arra, hogy a vizsgálati körülmények közötti különbségek minimálisak legyenek. A feljegyzett észleléseknek ki kell terjedniük többek között a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapota, a váladékok és kiválasztott anyagok előfordulása, valamint az autonóm aktivitás (például könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupillaméret, szokatlan légzési ritmusok) tekintetében megfigyelhető változásokra. A járás, a testtartás és a kézbevételre adott reakció megváltozását, valamint a klónusos vagy tónusos görcsök, sztereotip viselkedés (például túlzott mosdás, megkergülés) vagy bármilyen bizarr viselkedésmód (például öncsonkítás, hátrafelé járás) megfigyelt eseteit is fel kell jegyezni.

▼M5

Testtömeg és táplálék-/vízfogyasztás

38. A kezelés első napján, majd azt követően legalább hetente egyszer meg kell mérni a P-állatok testtömegét. Ezenkívül a P-nőstényeket a szoptatás ideje alatt ugyanazokon a napokon kell lemérni, mint a saját almukban lévő kölyköket (lásd a 44. bekezdést). Az F_1-állatok tömegét egyenként kell megmérni az elválasztáskor (PND 21), azt követően pedig legalább hetente. A testtömeget azon a napon is rögzíteni kell, amikor az állatok elérik a pubertást (a fityma különválása befejeződik vagy a hüvely átjárhatóvá válik). Minden állat tömegét megmérjük az elaltatáskor.

39. A takarmány- és vízfogyasztást (amennyiben a vizsgált vegyi anyag beadása az ivóvízben történik) a vizsgálat alatt legalább hetente rögzíteni kell, ugyanazon a napon, amikor az állatok testtömegét is mérik (kivéve az együttes tartás időszakát). Az F_1-állatok ketrecenkénti takarmányfogyasztását a kohortba történő beválasztás időpontjától kezdve hetente kell rögzíteni.

Ivari ciklus

40. A korábbi ismételt dózisú toxicitási vizsgálatokból esetleg már rendelkezésre állhatnak a vizsgált vegyi anyag ivari ciklusra gyakorolt hatásaival kapcsolatos előzetes információk, amelyeket fel lehet használni a kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat vizsgált vegyi anyagra szabott protokolljának megtervezése során. Az ivari ciklus (hüvelyi citológiával történő) értékelése általában a kezelési időszak elején indul és a párzás megerősítéséig vagy a kéthetes párzási időszak végéig folytatódik. Ha a nőstényeket a kezelést megelőzően már megvizsgáltuk normál ivari ciklusra, akkor célszerű a kezelés elindulása után is folytatni a kenetvételt, de ha a kezelés kezdetekor nem specifikus hatások lehetősége merül fel (például a takarmányfogyasztás jelentős csökkenése a vizsgálat elkezdése után), akkor az állatoknak a párosításhoz vezető kéthetes kenetvételi időszak kezdete előtt akár két hét időt is lehet adni, hogy alkalmazkodjanak a kezeléshez. A nőstények kezelési időszakának ily módon történő meghosszabbítása esetén (azaz ha a pároztatás előtti kezelés 4 hetes lesz) megfontolandó fiatalabb állatok beszerzése és a hímek párosítás előtti kezelésének meghosszabbítása. A hüvelyi/méhnyaki sejtek vétele során vigyázni kell arra, hogy ne sérüljön meg a nyálkahártya, és ne alakuljon ki ezáltal álvemhesség (10) (11).

41. A hüvelyi átjárhatóság kezdetét követően az 1.A kohortba tartozó F_1-nőstények hüvelyi keneteit naponta kell megvizsgálni, amíg az első elszarusodott kenet fel nem jegyezzük, annak érdekében, hogy meghatározzuk a két esemény közötti időintervallumot. Az 1.A kohortba sorolt F_1-nőstények ivari ciklusát is meg kell figyelni a PND 75-től kezdve két héten keresztül. Ezenkívül, ha az F_1-nemzedék pároztatására is szükség van, az 1.B kohortban hüvelyi citológiát kell végezni a párok kialakításának időpontjától a párzásra utaló bizonyíték észleléséig.

Pároztatás és vemhesség

42. A szokásos végpontokon (pl. testtömeg, takarmányfogyasztás, klinikai megfigyelések, beleértve a mortalitás/morbiditás ellenőrzését) kívül a párok kialakításának időpontját, valamint a megtermékenyítés és a fialás időpontját is rögzítjük és kiszámítjuk a prekoitális intervallumot (a párok kialakításától a megtermékenyítésig) és a vemhesség időtartamát (a megtermékenyítéstől a fialásig). A P-nőstényeket a várható fialás időpontjában gondosan meg kell vizsgálni a nehéz ellésre utaló jelek szempontjából. A fészkelő viselkedés vagy a szoptatási teljesítmény bármilyen eltérését fel kell jegyezni.

▼M5

43. A nap, amelyen a fialás lezajlik, a 0. laktációs nap (LD 0) az anyaállat számára és a 0. posztnatális nap (PND 0) az utódok számára. Másik lehetőségként az összehasonlítások a posztkoitális időn is alapulhatnak a vemhesség időtartamában mutatkozó különbségek posztnatális fejlődési adatokra gyakorolt zavaró hatásának megszüntetése érdekében, de a fialáshoz képest számított időtartamokat is fel kell jegyezni. Ez különösen fontos abban az esetben, ha a vizsgált vegyi anyag hatással van a vemhesség időtartamára.

Az utódok paraméterei

44. Az ellés után minden almot a lehető leghamarabb meg kell vizsgálni (PND 0 vagy 1) a kölykök számának és ivarának, a halvaszületések és élveszületések számának, valamint a makroszkópos rendellenességeknek a megállapítása céljából (külsőleg látható rendellenességek, beleértve a farkastorkot; a bőr alatti vérzést; a rendellenes bőrszínt vagy textúrát; a köldökzsinór jelenlétét; a tej hiányát a gyomorban; a beszáradt váladék jelenlétét). Ezenkívül az újszülöttek első klinikai vizsgálatának tartalmaznia kell a testhőmérséklet, az aktivitási állapot és a megfogásra adott reakció minőségi értékelését. A 0. posztnatális napon vagy egy későbbi időpontban elhullott kölykökben meg kell határozni az esetleges defektusokat és az elhullás okát. Az élő kölyköket meg kell számolni és egyenként meg kell mérni a 0. vagy 1. posztnatális napon, majd azt követően rendszeresen, például legalább a PND 4, 7, 14 és 21 napokon. Az állatok életkorának megfelelő klinikai vizsgálatokat az utódok testtömegének mérésekor meg kell ismételni, vagy gyakrabban, ha eset-specifikus megállapításokat tettünk a születéskor. A feljegyzett észleléseknek ki kell terjedniük többek között a külső rendellenességekre, a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapotára, a váladékok és kiválasztott anyagok előfordulására, valamint az autonóm aktivitásra. A testtartás, a járás bizonytalansága, a kézbevétel, valamint a tónusos vagy klónusos görcsök, sztereotip viselkedés vagy bizarr viselkedésmód megfigyelt eseteit is fel kell jegyezni.

45. Az anogenitális távolságot (AGD) a kölykökben legalább egy alkalommal meg kell mérni PND 0 és PND 4 között. A kölykök testtömegét azon a napon kell megmérni, amikor az AGD-t is mérjük, és az AGD-t normálni kell a kölykök méretére, ami lehetőleg a testtömeg köbgyöke (12). A 12. vagy 13. posztnatális napon ellenőrizni kell a mellbimbók/bimbóudvar jelenlétét hím kölykökben.

46. Minden kiválasztott F_1-állatot naponta kell értékelni a makk-fityma különválás (hímek) vagy vaginális átjárhatóság (nőstények) szempontjából, amit ezeknek a végpontoknak a várható elérése előtt kell megkezdeni, hogy észlelni lehessen, ha az állatok korábban érik el a szexuális érést. Fel kell jegyezni a nemi szervek minden rendellenességét, mint például a tartós vaginális filamentumot, hypospadiát vagy osztott hímvesszőt. Az F_1-állatok ivarérettségét a testi fejlődéssel kell összehasonlítani az életkornak és a testsúlynak a makk és a fityma különválásakor (hímek) vagy a hüvely kinyílásakor (nőstény) történő meghatározásával (13).

A potenciális fejlődési neurotoxicitás értékelése (2.A és 2.B kohort)

47. A neurotoxicitási értékeléshez a 2.A kohort mindegyik kezelési csoportjából 10 hím és 10 nőstény állatot és a 2.B kohort mindegyik kezelési csoportjából 10 hím és 10 nőstény állatot kell használni (mindegyik kohort esetében: almonként 1 hím vagy 1 nőstény, minden almot legalább 1 kölyöknek kell képviselnie; véletlenszerű kiválasztás). A 2.A kohort állatait riasztó hanghatásoknak, funkcionális megfigyelési sorozatnak, motoros aktivitási (lásd a 48-50. bekezdést) és neuropatológiai értékeléseknek (lásd

▼M5

a 74–75. bekezdést) kell alávetni. Törekedni kell arra, hogy minimálisak legyenek a kísérleti körülmények közötti eltérések és ne legyenek szisztematikus összefüggésben a kezeléssel. Változók, amelyek hatással lehetnek a viselkedésre: zajszint (pl. szakaszos zaj), hőmérséklet, páratartalom, világítás, szagok, napszak és zavaró környezeti tényezők. A neurotoxicitási vizsgálatok eredményeit a megfelelő történeti kontroll referencia tartományokhoz viszonyítva kell értelmezni. A 2.B kohort állatait neuropatológiai értékelésre kell használni a 21. vagy a 22. posztnatális napon (lásd a 74-75. bekezdést).

48. A riasztó hanghatásokra adott választ a 24. posztnatális napon (± 1 nap) kell megvizsgálni a 2.A kohort állatainak felhasználásával. A vizsgálat napját ellensúlyozni kell a kezelt és a kontroll csoportokban. Minden szakasz 50 vizsgálatból áll. A riasztó hanghatásokra adott választ vizsgáló tesztben meg kell határozni az átlagos válasz amplitúdóját a 10 vizsgálatból álló egyes blokkokban (5 blokk, egyenként 10-10 vizsgálattal), a vizsgálati feltételeket úgy optimalizálva, hogy azok tesztmenet alatti habituációt eredményezzenek. Ezeknek az eljárásoknak összhangban kell lenniük a B.53 vizsgálati módszerrel (35).

49. Egy megfelelő időpontban a PND 63 és a PND 75 között a 2.A kohort állatait egy funkcionális megfigyelési sorozatnak és a motoros aktivitást vizsgáló automatizált tesztnek vetjük alá. Ezeknek az eljárásoknak összhangban kell lenniük a B.43 (33) és a B.53 vizsgálati módszerrel (35). A funkcionális megfigyelési sorozat magában foglalja az állat megjelenésének, viselkedésének és funkcionális integritásának alapos leírását. Ezeket az állatoknak az otthonul szolgáló ketrecben, illetve az állatok áthelyezése után egy standard megfigyelő karámban (nyílt területen) – ahol az állatok szabadon mozognak – végzett megfigyelése, valamint manipulatív tesztek útján értékeljük. A tesztelésben a legkevésbé interaktívtól a leginkább interaktív felé kell haladni. A megfigyelések listáját az 1. függelék mutatja be. Minden állatot alaposan képzett megfigyelőknek kell megvizsgálniuk, akik nincsenek tisztában az állat kezelési állapotával, és szabványosított eljárásokat használnak a megfigyelői variabilitás minimalizálása érdekében. Amennyiben lehetséges, célszerű, hogy ugyanaz a megfigyelő értékelje az állatokat egy adott teszt során. Ha ez nem lehetséges, demonstrálni kell a megfigyelők közötti megbízhatóságot. A viselkedési vizsgálatban szereplő valamennyi paraméter esetében egyértelmű, operatív módon meghatározott skálákat és pontozási kritériumokat kell használni. Lehetőség szerint objektív mennyiségi méréseket kell kidolgozni azokhoz a megfigyelési végpontokhoz, amelyek szubjektív rangsorolást igényelnek. A motoros aktivitás esetében minden állatot külön-külön kell tesztelni. A tesztnek elegendően hosszú ideig kell tartania ahhoz, hogy a kontrollok esetében demonstrálni lehessen az tesztmenet alatti habituációt. A motoros aktivitást olyan automatizált aktivitásrögzítő készülékkel kell monitorozni, amely egyaránt képes az aktivitás növekedésének és csökkenésének észlelésére (vagyis a kiindulási aktivitás az eszközzel mérve ne legyen olyan alacsony, hogy kizárja az aktivitás csökkenésének kimutatását, és ne legyen olyan magas, hogy kizárja az aktivitás növekedésének kimutatását). Minden eszközt be kell vizsgálni olyan standard eljárásokkal, amelyek a lehető legnagyobb mértékben garantálják a különböző eszközök folyamatos és megbízható működését. A kezelési csoportokat a lehetséges mértékben kiegyensúlyozottan kell szétosztani a készülékek között. A kezelési csoportokat ellensúlyozni kell a tesztidőpontok között, hogy kiküszöbölhető legyen az aktivitás cirkadián ritmusának zavaró hatása.

50. Ha a meglévő adatok azt mutatják, hogy egyéb funkcionális vizsgálatra is szükség van (pl. érzékszervi, szociális, kognitív), ezeket úgy kell beilleszteni, hogy ne veszélyeztessék a vizsgálatban végzett egyéb értékelések integritását. Amennyiben ezeket a vizsgálatokat ugyanazokban az állatokban hajtják végre, amelyeket a standard riasztó hanghatások vizsgálata, a funkcionális megfigyelési vizsgálat és a motoros aktivitás vizsgálata során is használtak, a különböző teszteket úgy kell ütemezni, hogy minimálisra csökkentsék annak a kockázatát, hogy veszélyeztessék ezeknek a teszteknek az integritását. A kiegészítő eljárások különösen akkor lehetnek hasznosak, ha az empirikus megfigyelés, a várható hatások, illetve a hatásmechanizmus egy bizonyos típusú neurotoxicitásra utalnak.

▼M5

A potenciális fejlődési immunotoxicitás értékelése (3. kohort)

51. Az 56. posztnatális napon (± 3 nap) a 3. kohort mindegyik kezelési csoportjának állatai közül 10 hímet és 10 nőstényt (almonként 1 hímet vagy 1 nőstényt; minden almot legalább 1 kölyök képvisel; véletlenszerű kiválasztás) egy T-sejt dependens antitest válasz vizsgálatban, azaz egy T-sejt függő antigénre, mint például a birka vörövértestre (sheep red blood cells, SRBC), vagy a kulcslyuk csiga hemocianinra (keyhole limpet hemocianin, KLH) adott primer IgM antitestreakció vizsgálatban kell felhasználni, összhangban az aktuális immunotoxicitási vizsgálati eljárásokkal (14) (15). A választ a specifikus plakk-képző sejteknek (PFC) a lépben való megszámlálásával vagy az SRBC- vagy KLH-specifikus IgM antitestek szérumtiterének ELISA-val történő meghatározásával lehet kiértékelni, a csúcsválasz időpontjában. A válaszok általában négy (PFC válasz) vagy öt (ELISA) nappal az intravénás immunizálást követően adják a csúcsot. Abban az esetben, ha az elsődleges antitestválaszt a plakk-képző sejtek megszámolásával vizsgálják, megengedett, hogy az állatok alcsoportjait különböző napokon értékeljük, feltéve, hogy: az alcsoport immunizálását és elaltatását úgy időzítjük, hogy a PFC-ket a válasz csúcsán számolják meg; az alcsoportok azonos számú hím és nőstény utódot tartalmaznak minden dóziscsoportból, beleértve a kontrollokat is; és az alcsoportokat körülbelül ugyanabban a posztnatális életkorban értékeljük.A vizsgált vegyi anyaggal való expozíció a lépeknek a PFC-válaszhoz való összegyűjtését vagy a szérumoknak az ELISA-vizsgálathoz való levételét megelőző napig folytatódik.

A lehetséges reprodukciós toxicitás nyomonkövető értékelése (1.B kohort)

52. Az 1.B kohortba tartozó állatokat a 90. posztnatális napon túl is kezelés alatt lehet tartani, és pároztatni lehet, hogy F_2-generációt állítsanak elő, ha szükséges. Azonos dóziscsoportba tartozó hímeket és nőstényeket kell összeköltöztetni (elkerülve a testvérek párosítását), legfeljebb két hét időtartamra, amely a 90. posztnatális napon vagy azt követően kezdődhet, de a 120. posztnatális napnál nem később. Az eljárások hasonlóak a P-állatoknál használt eljárásokhoz. A bizonyítékok súlya alapján azonban az almokat már a 4. posztnatális napon el lehet altatni ahelyett, hogy végigkövetnénk őket az elválasztásig vagy azon túl.

MEGFIGYELÉSEK A VIZSGÁLAT LEZÁRÁSAKOR

Klinikai biokémia/Hematológia

53. A P-állatokban figyelemmel kell kísérni a szisztémás hatásokat. A vizsgálat lezárásakor éhgyomri vérmintát kell venni egy meghatározott helyről tíz véletlenszerűen kiválasztott P-hímből és -nőstényből dózicsoportonként, amelyet megfelelő körülmények mellett kell tárolni, és részleges vagy teljes körű hematológiai, klinikai biokémiai, valamint T4- és TSH-vizsgálatnak vagy a vizsgált vegyi anyag ismert hatásprofilja által indikált egyéb vizsgálatoknak kell alávetni (lásd az OECD 151. iránymutatását (40)). A vizsgálati időszak végén a következő hematológiai paramétereket kell megvizsgálni: hematokrit, hemoglobin-koncentráció, vörösvértest-szám, teljes és differenciált vérkép, trombocitaszám és véralvadási idő/képesség. A vérplazma- és vérszérum-meghatározások során vizsgálandó elemek: vércukor, összkoleszterin, karbamid, kreatinin, összprotein, albumin és legalább két, a májsejti hatásokat jelző enzim (pl. alanin-aminotranszferáz, aszpartát-aminotranszferáz, alkalikus foszfatáz, gamma-glutamil-transzpeptidáz és szorbitol-dehidrogenáz). További enzimek vizsgálata és az epesavak mérése

▼M5

bizonyos körülmények között hasznos információkkal szolgálhat. Ezenkívül az összes állatból vért lehet venni és eltárolni egy későbbi időpontban végzendő esetleges analízis céljára, amely segítséget nyújthat a kétes hatások tisztázásában vagy a belső expozíciós adatok előállításában. Ha a P-állatok második pároztatása nem szerepel a tervekben, akkor a vérmintákat az állatok ütemterv szerinti elpusztításakor végzett eljárás részeként vagy közvetlenül azelőtt kell levenni. Abban az esetben, ha az állatokat megtartják, a vérmintákat néhány nappal az állatok második alkalommal történő pároztatása előtt kell levenni. Annak az esetnek a kivételével, ha az ismételt dózisú vizsgálatokból származó adatok azt mutatják, hogy a vizsgált vegyi anyag nem befolyásolja a paramétert, az állatok elpusztítása előtt vizeletvizsgálatot kell elvégezni, és a következő paramétereket kell kiértékelni: makroszkópos megjelenés, mennyiség, ozmolalitás vagy fajsúly, pH-érték, fehérje, glükóz, vér és vérsejtek, sejttörmelék. A vizeletet a vizsgált vegyi anyag és/vagy a metabolit(ok) kiválasztódásának monitorozására is lehet gyűjteni.

54. Az F_1-állatokban is figyelemmel kell kísérni a szisztémás hatásokat. A vizsgálat lezárásakor éhgyomri vérmintát kell venni egy meghatározott helyről tíz véletlenszerűen kiválasztott 1.A kohort hímből és nőstényből dózicsoportonként, amelyet megfelelő körülmények mellett kell tárolni, és standard klinikai biokémiai vizsgálatnak kell alávetni, beleértve a pajzsmirigyhormonok (T4 és TSH) szérumszintjeinek értékelését, a hematológiát (teljes és differenciált leukocita- és vörösvértest-szám) és a vizeletvizsgálatot.

55. A 4. posztnatális napon megmaradó kölyköket makroszkópos boncolásnak kell alávetni, és meg kell fontolni a szérum pajzsmirigyhormon (T4) koncentrációjának mérését. Szükség esetén az újszülött (PND 4) vért a biokémiai/pajzsmirigyhormon analízisekhez almonként egyesíteni lehet. A 22. posztnatális napon makroszkópos boncolásnak alávetett választott kölykökből (kohortokba be nem válogatott F_1-kölykök) is lehet vért gyűjteni a T4- és TSH-analízishez.

Spermaparaméterek

56. A sperma paramétereit minden P-generációs hímben mérni kell, kivéve, ha a meglévő adatok azt mutatják, hogy a sperma paraméterei nem változtak a 90 napos vizsgálat során. A spermaparaméterek vizsgálatát minden 1.A kohort hímben el kell végezni.

57. A vizsgálat végén a here és a mellékhere tömege minden P és F_1 (1.A kohort) hím esetében rögzítésre kerül. Legalább egy herét és egy mellékherét félre kell tenni a kórszövettani vizsgálathoz. A fennmaradó mellékherét a mellékhere farkában lévő spermiumtartalék számszerűsítésére használjuk (16) (17). Ezen túlmenően, a mellékhere farkából (vagy az ondóvezetékből) spermiumokat kell gyűjteni olyan módszerekkel, amelyek minimálisra csökkentik a spermiumok károsodását, amely zavarná a spermiumok motilitásának és morfológiájának értékelését (18).

58. A spermiumok mozgékonyságát lehet közvetlenül az állat elpusztítása után értékelni vagy felvételt is lehet készíteni a későbbi analízishez. A fokozottan motilis spermiumok százalékos arányát meg lehet határozni szubjektív vagy objektív módon számítógép által támogatott mozgáselemzés segítségével (19) (20) (21) (22) (23) (24). A spermiumok morfológiájának értékeléshez mellékheréből (vagy ondóvezetékből) származó spermamintát kell megvizsgálni fixált vagy nedves állapotban (25), és mintánként legalább 200 spermiumot kell kategorizálni normál (fej és középrész/farok egyaránt normál) vagy kóros spermiumként. A morfológiai sperma-rendellenességek közé tartoznak például a fúzió, az izolált fejek és a torz fej és/vagy farok (26). A torz vagy nagy spermiumfej a spermiumképződés hibáira utalhat.

59. Ha a spermaminták le vannak fagyasztva, a kenetek le vannak fixálva és a spermiumok mozgékonyságának elemzését szolgáló felvételeket a boncolás időpontjában rögzítettük (27), a későbbi elemzést a kontroll és a magas dózissal kezelt hímekre lehet korlátozni. Ha azonban a kezeléssel összefüggő hatások figyelhetők meg, a kisebb dózissal kezelt csoportokat is értékelni kell.

▼M5

Makroszkópos boncolás

60. A vizsgálat befejezésekor vagy idő előtti elhullás esetén valamennyi P- és F_1-állatban makroszkóposan meg kell vizsgálni az esetleges strukturális rendellenességeket vagy patológiás elváltozásokat. Külön figyelmet kell szentelni a szaporítószerveknek. Az elhullásközeli állapotba került és ezért humánus módon exterminált és az elpusztult kölyköket jegyzőkönyvezni kell, és a nem macerált kölykökben meg kell határozni az esetleges defektusokat és/vagy az elhullás okát, majd konzerválni kell őket.

61. A felnőtt P- és F_1-nőstények esetében a boncolás napján meg kell vizsgálni a hüvelyi kenetet, hogy meghatározzuk az ivari ciklus szakaszát, és hogy lehetővé tegyük a korreláció felállítását a szaporítószervek kórszövettanával. A P-nőstények (és az F_1-nőstények, ha vannak ilyenek) méhében megvizsgáljuk az implantációs helyek jelenlétét és számát, olyan módon, amely nem veszélyezteti a kórszövettani értékelést.

Szervtömeg és a szövetek megőrzése – P és F_1 felnőtt állatok

62. A vizsgálat befejezésének időpontjában a testtömegeket és a megfelelő kohortokba (az alábbiak szerint) tartozó valamennyi P- és F_1-felnőtt állat alább felsorolt szerveinek nedves tömegét a lehető leghamarabb meg kell határozni, hogy a kimetszés utáni kiszáradás elkerülhető legyen. Ezeket a szerveket ezután megfelelő körülmények között meg kell őrizni. Eltérő rendelkezés hiányában a páros szerveket külön-külön vagy együtt is le lehet mérni, összhangban a vizsgálatot végző laboratórium általános gyakorlatával.

— méh (petevezetékekkel és méhnyakkal), petefészkek,

— here, mellékhere (teljes és cauda a spermiumszám meghatározásához használt mintákhoz),

— prosztata (dorzolaterális és ventrális részek együtt). A prosztata és a kapcsolódó szervek megtisztítása során ügyelni kell arra, hogy ne szúrjuk át a folyadékkal teli ondóhólyagokat. Ha kezeléssel összefüggő hatás mutatkozik a prosztata teljes tömegében, a fixálás után a dorzolaterális és ventrális szegmenseket gondosan szét kell választani, és külön-külön le kell mérni,

— ondóhólyagok a koaguláló mirigyekkel és váladékukkal (egy egységként),

— agy, máj, vese, szív, lép, csecsemőmirigy, agyalapi mirigy, pajzsmirigy (fixálás után), mellékvesék és ismert célszervek vagy -szövetek.

63. A fent felsorolt szervek mellett a perifériás ideg-, az izom-, a gerincvelő-, a szem- és látóideg-, az emésztőrendszer-, a húgyhólyag-, a tüdő-, a légcső- (a pajzsmiriggyel és a mellékpajzsmiriggyel), a csontvelő-, az ondóvezeték- (hímek), az emlőmirigy- (hímek és nőstények), és a hüvelymintákat megfelelő körülmények között meg kell őrizni.

64. Az 1.A kohort állatainak minden szervét meg kell mérni és meg kell őrizni a kórszövettani vizsgálathoz.

65. A pre- és posztnatálisan kiváltott immunotoxikus hatások vizsgálatához az 1.A kohort mindegyik kezelési csoportjából 10 hím és 10 nőstény állatot (almonként 1 hím vagy 1 nőstény; minden almot legalább 1 kölyöknek kell képviselnie; véletlenszerű kiválasztás) a következő vizsgálatoknak kell alávetni az elaltatáskor:

— az expozíciós útvonalhoz kapcsolódó és attól távoli területről származó nyirokcsomók lemérése (a mellékvese mirigyek, a csecsemőmirigy és a lép tömege mellett, amelyeket már valamennyi 1.A kohort állaton megmértek),

▼M5

— a lép-limfocita alcsoport analízise (CD4+ és CD8+ T-limfociták, B-limfociták, természetes ölősejtek) a lép egyik felének felhasználásával, a lép másik felét a kórszövettani értékeléshez konzerváljuk.

A lép-limfocita szubpopulációk nem immunizált (1.A kohort) állatokban történő elemzése meghatározza, hogy az expozíció összefügg-e a „segítő” (CD4+) vagy citotoxikus (CD8+) thymus-eredetű limfociták vagy természetes ölősejtek (NK) (gyors válasz neoplasztikus sejtekre és kórokozókra) immunológiai egyensúlyi eloszlásának eltolódásával.

66. A 1.B kohort állatok esetében a következő szerveket kell megmérni és a megfelelő szöveteiből blokkokat készíteni:

— vagina (nem mért),

— méh a méhnyakkal,

— petefészkek,

— here (legalább egy),

— mellékherék,

— ondóhólyag és koaguláló mirigyek,

— prosztata,

— agyalapi mirigy,

— azonosított célszervek.

Az 1.B kohort kórszövettani értékelését akkor kell elvégezni, ha az 1.A kohort eredményei kétesek, illetve szaporodási vagy endokrin mérgező anyagok gyanúja merül fel.

67. 2.A és 2.B kohort: Fejlődési neurotoxicitási vizsgálat (PND 21 vagy PND 22 és felnőtt utód). A 2.A kohort állatokat a viselkedési teszt után el kell altatni, az agytömegeket fel kell jegyezni és teljes idegkórszövettani vizsgálatot kell végezni a neurotoxicitás értékelése céljából. A 2.B kohort állatokat a 21. vagy 22. posztnatális napon el kell altatni, az agytömegeket fel kell jegyezni és az agyakat mikroszkóppal meg kell vizsgálni a neurotoxicitás értékelése céljából. A 2.A kohortba tartozó állatoknál előírás a perfúziós fixálás, ami választható a 2.B kohortba tartozó állatok esetében, amint azt a B.53 vizsgálati módszer előírja (35).

Szervtömeg és a szövetek megőrzése – F_1 elválasztott állatok

68. A kohortokba be nem válogatott kölyköket, beleértve a csökött egyedeket, az elválasztás után a 22. posztnatális napon el kell altatni, kivéve, ha az eredmények azt mutatják, hogy élő állatokban végzendő további vizsgálatokra van szükség. Az elaltatott kölykökön makroszkópos boncolást kell végezni, beleértve a szaporítószervek értékelését a 62. és 63. bekezdésben leírtak szerint. Annyi alomból, amennyiből csak lehetséges, nemenként és csoportonként legfeljebb 10 kölyök esetében meg kell mérni az agy, a lép és a csecsemőmirigy tömegét, és megfelelő körülmények között meg kell őrizni ezeket a szerveket. Ezenkívül ezeknek a hím és nőstény kölyköknek az emlőszöveteit meg lehet őrizni további mikroszkópos elemzés céljára ([1]) (lásd az OECD 151. iránymutatását (40)). A makroszkópos rendellenességeket és a célszöveteket meg kell őrizni az esetleges szövettani vizsgálat céljából.

([1]) A kutatások kimutatták, hogy az emlőmirigy, különösen az emlőmirigy fejlődésének az élet korai szakaszában zajló fázisában, az ösztrogénaktivitás érzékeny végpontja. Ajánlott a vizsgálati módszerbe olyan végpontok beillesztése, amelyek a mindkét nemhez tartozó kölykök emlőmirigyét érintik, ha validálták ezeket.

▼M5

Kórszövettan – P-állatok

69. A 62. és 63. bekezdésben felsorolt szervek teljes kórszövettani vizsgálatát minden magas dózissal kezelt és kontroll P-állatban el kell végezni. A kezeléssel összefüggő változásokat mutató szerveket az alacsonyabb dóziscsoportokba tartozó állatokban is meg kell vizsgálni a NOAEL meghatározása érdekében. El kell végezni továbbá valamennyi olyan állat szaporítószerveinek kórszövettani vizsgálatát, amelyek gyaníthatóan csökkent termékenységgel bírnak, így például azok esetében, amelyek nem tudtak párzani, megfoganni, utódokat nemzeni vagy egészséges utódokat a világra hozni, vagy amelyeknél az ivari ciklusra vagy a spermiumok számára, motilitására vagy morfológiájára gyakorolt hatásokat észleltünk, és valamennyi makroszkópos elváltozást is kórszövettani vizsgálatnak kell alávetni.

Kórszövettan – F_1-állatok

Az 1. kohort állatai

70. A 62. és 63. bekezdésben felsorolt szervek teljes kórszövettani vizsgálatát minden magas dózissal kezelt és kontroll felnőtt 1.A kohort állatban el kell végezni. Az almokat legalább nemenként 1 kölyöknek kell képviselni. A kezeléssel összefüggő változásokat és makroszkópos léziókat mutató szerveket és szöveteket az alacsonyabb dóziscsoportokba tartozó állatokban is meg kell vizsgálni a NOAEL meghatározása érdekében. A limfoid szervekre pre- és posztnatális korban gyakorolt hatások értékeléséhez az összegyűjtött nyirokcsomók és csontvelő kórszövettani vizsgálatát is el kell végezni az 1.A kohortba tartozó 10 hím és 10 nőstény állaton, a csecsemőmirigy, a lép és a mellékvesék 1A állatokban már elvégzett kórszövettani értékelése mellett.

71. Szaporodási vagy endokrin mérgező anyagok gyanúja esetén az 1.B kohortba tartozó valamennyi állatnak a 66. bekezdésben leírt blokk állapotba feldolgozott szaporodási és endokrin szövetein kórszövettani vizsgálatot kell végezni. Az 1.B kohorton szintén szövettani vizsgálatot kell végezni, ha az a 1.A kohort eredményei kétesek.

72. A felnőtt nőstények petefészkeinek tüszőkezdeményeket és növekvő tüszőket, valamint sárgatesteket is kell tartalmaznia; ezért a kórszövettani vizsgálatnak az F_1-nőstényekben a tüszőkezdemények és a kis fejlődő tüszők, valamint a sárgatestek mennyiségi értékelését kell céloznia; az állatok számának, a petefészek-szekció kiválasztásának, valamint a szekcióból vett minta méretének statisztikailag megfelelőnek kell lennie az alkalmazott értékelési eljáráshoz. A tüszőket először a kontroll és a nagy dózissal kezelt állatokban lehet megszámlálni, és abban az esetben, ha káros hatást észlelnek az utóbbiban, az alacsonyabb dózissal kezelt állatokat is meg kell vizsgálni. A kezelt és kontroll petefészkek összehasonlításához a vizsgálatoknak ki kell terjedniük a tüszőkezdemények összeszámlálására, amelyekhez hozzá lehet venni a kis növekvő tüszőket is (lásd az OECD 151. iránymutatását (40)). A sárgatestek értékelését az ivari ciklus vizsgálatával párhuzamosan kell elvégezni, hogy a ciklus szakaszát figyelembe lehessen venni az értékelés során. A petevezetéket, a méhet és a hüvelyt a szervre jellemző megfelelő fejlődés szempontjából is megvizsgáljuk.

73. A herék részletes szövettani vizsgálatát az F_1-hímeken végezzük el, hogy azonosítsuk a here differenciálására és fejlődésére, valamint a spermatogenezisre gyakorolt kezeléssel összefüggő hatásokat (38). Amennyiben lehetséges, a rete testis részeit is meg kell vizsgálni. A mellékhere fejét, testét és farkát, valamint az ondóvezetéket a szervre jellemző megfelelő fejlődés, valamint a P-hímeknél szükséges paraméterek szempontjából vizsgáljuk.

▼M5

A 2. kohort állatai

74. A 2.A kohort valamennyi magas dózissal kezelt és kontroll állatán nemenként idegkórszövettani vizsgálatot végzünk az idegrendszeri vizsgálat befejezését követően (PND 75 után, de nem később, mint PND 90). Az agy kórszövettani vizsgálatát a 2.B kohort minden magas dózissal kezelt és kontroll állatán nemenként a 21. vagy 22. posztnatális napon végezzük el. A kezeléssel összefüggő változásokat mutató szerveket vagy szöveteket az alacsonyabb dóziscsoportokba tartozó állatokban is meg kell vizsgálni a NOAEL meghatározása érdekében. A 2.A és 2.B kohortba sorolt állatok esetében az agy több metszetét is megvizsgáljuk a szaglóhagymák, cerebrális cortex, hippocampus, bazális ganglionok, thalamus, hypothalamus, középagy (tectum, tegmentum, és agyi pedunculusok), agytörzs és a kisagy vizsgálata érdekében. Kizárólag a 2.A kohort esetében a szemeket (retina és látóideg) és a perifériás ideg-, izom- és a gerincvelőmintákat is megvizsgáljuk. Ezeknek az idegkórszövettani eljárásoknak összhangban kell lenniük a B.53 vizsgálati módszerrel (35).

75. A morfometriai (kvantitatív) értékeléseket az agy reprezentatív területein (megbízható mikroszkopikus tájékozódási pontok alapján gondosan kiválasztott homológ szakaszok) kell végezni, és ezek az értékelések magukban foglalhatják a specifikus agyi régiók lineáris és/vagy területi méréseit is. Legalább három egymást követő metszetet kell készíteni minden tájékozódási pontnál (szint), hogy kiválasztható legyen az adott értékelendő agyi terület leginkább homológ és reprezentatív metszete. A kórboncnoknak megfelelő döntést kell hoznia, hogy a mérésre előkészített metszetek homológok-e a mintakészlet egyéb metszeteivel, és így alkalmasak-e a beválogatásra, hiszen különösen a lineáris mérések viszonylag rövid távolságon belül is változhatnak (28). A nem homológ metszetek használata tilos. Bár a cél az, hogy az erre a célra fenntartott valamennyi állatból (10/nem/dózisszint) mintát vegyünk, kisebb állatszámok is elegendők lehetnek. A nemenként és dózisszintenként kevesebb mint 6 állatból származó minta azonban általában nem tekinthető elégségesnek ehhez a vizsgálati módszerhez. Sztereológiát lehet használni a kezelések egyes paraméterekre, mint például bizonyos neuroanatómiai régiók térfogatára vagy sejtjeinek számára gyakorolt hatásainak azonosítására. A szövetminták előkészítésének valamennyi lépése során, a szövetek fixálásától kezdve a szövetminták kimetszésén és a szövetek feldolgozásán át a metszetek festéséig, kiegyensúlyozott elrendezést kell alkalmazni úgy, hogy minden tételnek minden dóziscsoportból kell reprezentatív mintákat tartalmaznia. Ha morfometriai vagy sztereológiai elemzést kell végezni, az agyszöveteket minden dózisszinten egyidejűleg kell a megfelelő közegbe ágyazni annak érdekében, hogy elkerüljük a zsugorodási műtermékek kialakulását, amelyek a fixálószerben való hosszabb tároláshoz társulhatnak.

JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

76. Az adatokat külön-külön és táblázatos formában összefoglalva is be kell mutatni. Szükség esetén minden vizsgálati csoport és generáció esetében a következőket kell jegyzőkönyvezni: az állatok száma a vizsgálat kezdetekor, a vizsgálat során elpusztult vagy humánus okokból elpusztított állatok száma, minden elhullás vagy humánus elpusztítás időpontja, a termékeny állatok száma, a vemhes nőstények száma, az almokat ellő nőstények száma, a toxicitás jeleit mutató állatok száma. A toxicitás leírását is jegyzőkönyvezni kell, beleértve kezdetének idejét, időtartamát és súlyosságát.

77. A számszerű eredményeket megfelelő és elfogadott statisztikai módszerrel kell értékelni. A statisztikai módszereket a vizsgálati elrendezés részeként kell kiválasztani, és megfelelően kell kezelni a nem normális adatokat (pl. számlálási adatok), a cenzúrázott adatokat (pl. korlátozott megfigyelési

▼M5

idő), a nem függetlenséget (pl. az alom hatásai és az ismételt mérések) és a nem egyenlő varianciákat. Az általánosított lineáris kevert modellek és a dózis-válasz modellek az e vizsgálati módszer által generált adatok elemzéséhez megfelelő elemzési eszközök széles körét lefedik. A jegyzőkönyvnek elegendő információt kell tartalmaznia az alkalmazott elemzési módszerrel és számítógépes programmal kapcsolatban ahhoz, hogy egy független bíráló vagy statisztikus értékelhesse vagy újraértékelhesse az elemzést.

Az eredmények értékelése

78. A vizsgálat eredményeit a megfigyelt hatások, ezen belül a boncolási és mikroszkópos eredmények szempontjából kell értékelni. Az értékelésnek tartalmaznia kell a kapcsolatot, vagy annak hiányát, a dózis és a rendellenességek – beleértve a makroszkópos léziókat – jelenléte, előfordulása és súlyossága között. A célszerveket, a termékenységet, a klinikai tüneteket, a reprodukciós és alomteljesítményt, a testtömeg változásait, a mortalitást és minden más toxikológiai és fejlődési hatást is értékelni kell. Különös figyelmet kell fordítani az ivarspecifikus változásokra. A vizsgálati eredmények értékelésekor figyelembe kell venni a vizsgált vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságait és az esetlegesen rendelkezésre álló toxikokinetikai adatokat, beleértve a placentán át történő transzfert és a tejbe történő kiválasztódást is.

Vizsgálati jegyzőkönyv

79. A vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell a jelen vizsgálatban a P-, F_1- és – adott esetben – F_2-állatokból gyűjtött következő információkat:

Vizsgált vegyi anyag:

— a vizsgált vegyi anyag kémiai, toxikokinetikai és toxikodinamikai tulajdonságaira vonatkozó valamennyi rendelkezésre álló információ,

— azonosító adatok,

— tisztaság.

Vivőanyag (ha van):

— a vivőanyag megválasztásának indokolása, ha az nem víz.

Kísérleti állatok:

— felhasznált faj/törzs,

— az állatok száma, kora és neme,

— származás, tartási körülmények, takarmány, fészekrakó anyagok stb.,

— az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetekor,

— a P-nőstények hüvelykenet-adatai a kezelés megkezdése előtt (ha az adatok összegyűjtése megtörtént ebben az időpontban),

— a P-generáció párosításának nyilvántartása, megadva a hím és nőstény partnereket és a pároztatás sikeressége,

— a felnőtt F_1-állatok származási almának nyilvántartása.

Vizsgálati körülmények:

— az adagolási szintek megválasztásának indoklása,

— a vizsgált vegyi anyag formulázásával/a táplálék előkészítésével, az elért koncentrációval kapcsolatos információk,

▼M5

— a készítmény stabilitása és homogenitása a vivőanyagban vagy hordozóban (pl. takarmány, ivóvíz), a vérben és/vagy a tejben a felhasználás és a felhasználások között tárolás feltételei mellett,

— a vizsgált vegyi anyag beadására vonatkozó adatok,

— átszámítás a vizsgált vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/testtömeg kg/nap), ha alkalmazható,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány összetétele, ha rendelkezésre áll),

— a randomizálási eljárások részletes leírása, amelyeket a kölykök selejtezésre történő kiválasztására és a kezelési csoportokba való besorolására használtak,

— környezeti feltételek,

— a vizsgáló személyzet listája, beleértve a szakmai képzéseket.

Eredmények (összefoglaló és egyéni adatok, nemek és adagolás szerint):

— a P- és F_1-állatok takarmányfogyasztása, vízfogyasztása (ha rendelkezésre áll), takarmányhasznosítása (egy gramm elfogyasztott takarmányra eső testtömeg-gyarapodás, kivéve az együttélés és a szoptatás időszakát), vizsgált vegyi anyag fogyasztása (takarmányban/ivóvízben történő adagolás esetén),

— felszívódási adatok (ha vannak),

— resttömeg adatok a P-generációnál,

— a kiválasztott F_1-állatok testtömeg adatai az elválasztás után,

— a vizsgálat során bekövetkező elhullás időpontja, illetve hogy az állatok életben maradtak-e az exterminálásig,

— a klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (a változások visszafordíthatók-e vagy sem),

— hematológia, vizeletvizsgálat és klinikai kémiai adatok, beleértve a TSH- és T4-értékeket,

— a lépsejtek fenotípusos elemzése (T-, B-, NK-sejtek),

— csontvelő cellularitás,

— toxikus reakcióra vonatkozó adatok,

— normális vagy abnormális ivari ciklust mutató P- és F_1-nőstények száma és a ciklus időtartama,

— párzásig eltelt idő (prekoitális intervallum, a párosítás és a párzás közötti napok száma),

— a szaporodásra gyakorolt toxikus és más hatások, beleértve azoknak az állatoknak számát és százalékos arányát, amelyeknél megvalósult a párzás, a vemhesség, a fialás és a szoptatás, azoknak a hímeknek a számát és százalékos arányát, amelyek vemhességet váltottak ki, azoknak a nőstényeknek a számát és százalékos arányát, amelyek dystocia/elhúzódó vagy nehéz ellés jeleit mutatták,

— a vemhesség és – ha rendelkezésre áll – a fialás időtartama,

— a beágyazódások száma, az alom nagysága és a hím kölykök aránya,

— a beágyazódás utáni veszteségek, az élveszületések és halvaszületések száma és százalékos aránya,

▼M5

— az alom tömege és a kölykök tömege (hímek, nőstények és kombinált), a csökött egyedek száma, ha megállapításra került,

— a szemmel látható rendellenességeket mutató kölykök száma,

— az utódokra, a születés utáni növekedésre, az életképességre gyakorolt toxikus és egyéb hatások stb.,

— a fizikai tájékozódási pontokra vonatkozó adatok kölykökben és egyéb posztnatális fejlődési adatok,

— az F_1-állatok nemi érésére vonatkozó adatok,

— adott esetben a kölykökben és felnőtt állatokban végzett funkcionális megfigyelésekkel kapcsolatos adatok,

— resttömeg az elaltatáskor, valamint a P- és felnőtt F_1-állatok abszolút és relatív szervtömegadatai,

— boncolási eredmények,

— az összes kórszövettani lelet részletes ismertetése,

— teljes ondósejtszám a mellékhere farki részében, az előrehaladó mozgást végző ondósejtek százalékos aránya, morfológiailag normál ondósejtek százalékos aránya és az azonosított rendellenességet mutató ondósejtek százalékos aránya a P- és F_1-hímekben,

— adott esetben a P- és F_1-nőstények petefészkeiben található tüszők száma és érési szakaszai,

— a sárgatestek száma az F_1-nőstények petefészkeiben,

— adott esetben az eredmények statisztikai feldolgozása.

A 2. kohort paraméterei:

— a megfigyelések és eljárások szabványosítására használt eljárások, valamint a megfigyelések pontozására szolgáló operatív definíciók részletes leírása,

— az alkalmazott vizsgálati eljárások listája, alkalmazásuk indoklásával,

— az alkalmazott viselkedési/funkcionális, neuropatológiai és morfometriás eljárások részletei, beleértve az automatizált eszközökre vonatkozó információkat és adatokat,

— az eszközök kalibrálását szolgáló és egyenértékűségüket biztosító, illetve a kezelési csoportoknak a vizsgálati eljárásokban való kiegyensúlyozását biztosító eljárások,

— a szakmai megítélést igénylő bármilyen döntés rövid indoklása,

— a viselkedési, funkcionális, neuropatológiai és morfometriás eredmények részletes leírása nemek és dóziscsoportok szerint, beleértve a kontrollokhoz viszonyított növekedést és csökkenést,

— agytömeg,

— a neurológiai tünetekből és léziókból levezetett diagnózisok, beleértve a természetesen előforduló betegségeket vagy állapotokat,

— a példaértékű leletekről készült képek,

— a morfometriára használt metszetek homológ voltának értékelésére szolgáló kis nagyítású képek,

▼M5

— az eredmények statisztikai feldolgozása, beleértve az adatok és az eredmények elemzésére használt statisztikai modelleket, függetlenül attól, hogy szignifikánsak voltak-e vagy sem,

— bármely más toxikus hatás és a vizsgált vegyi anyag neurotoxicitási potenciáljával kapcsolatban levont következtetések kapcsolata nemenként és csoportonként,

— a toxikokinetikai információk hatása a következtetésekre,

— a vizsgálati módszer megbízhatóságát és érzékenységét alátámasztó adatok (azaz a pozitív és a történeti kontroll adatok),

— a neuropatológiai és funkcionális hatások közötti kapcsolatok, ha vannak ilyenek,

— NOAEL vagy benchmark dózis az anyaállatok és az utódok esetében, nemenként és dóziscsoportonként,

— az adatok értelmezésének diszkussziója az eredmények alapján, beleértve azt a következtetést, hogy a vizsgált vegyi anyag okozott-e fejlődési neurotoxicitást vagy nem, valamint a NOAEL-t.

A 3. kohort paraméterei:

— a szérum IgM-antitest titere (SRBC- vagy KLH-szenzitizáció), vagy a lép IgM PFC-egységek (SRBC-szenzitizáció),

— a TDAR-módszer teljesítményét a laboratóriumi optimalizálási folyamat részeként igazolni kell a vizsgálat első alkalommal való felállításakor, illetve rendszeresen (pl. évente) minden laboratóriumban,

— az adatok értelmezésének diszkussziója az eredmények alapján, beleértve azt a következtetést, hogy a vizsgált vegyi anyag okozott-e fejlődési immunotoxicitást vagy nem, valamint a NOAEL-t.

Az eredmények tárgyalása

Következtetések, ezen belül a szülői és utódhatásokra vonatkozó NOAEL-értékek

Rendelkezésre kell bocsátani minden olyan információt is, amelyet nem a vizsgálat során gyűjtöttek, de hasznos lehet az eredmények értelmezéséhez (pl. a hatások hasonlósága bármely ismert neurotoxikus anyaghoz).

Az eredmények értelmezése

80. A kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat információkkal szolgál valamely vegyi anyagnak a szaporodási ciklus összes fázisában történő, ismételt expozíciója hatásairól, szükség szerint. A vizsgálat különösen a szaporítórendszerrel, valamint az utódok fejlődésével, növekedésével, túlélésével és funkcionális végpontjaival kapcsolatban ad információkat a 90. posztnatális napig.

81. A vizsgálat eredményeinek értelmezésekor figyelembe kell venni a vegyi anyagról rendelkezésre álló összes információt, beleértve a fizikai-kémiai, valamint toxikokinetikai és toxikodinamikai tulajdonságokat, a szerkezeti analógokra vonatkozó lényeges információkat, és a vizsgált vegyi anyaggal korábban végzett toxicitási vizsgálatok eredményeit (pl. akut toxicitás, ismételt alkalmazás utáni toxicitás, mechanisztikus vizsgálatok, illetve az azt értékelő vizsgálatok, hogy vannak-e a fajok között jelentős mennyiségi és minőségi különbségek az *in vivo/in vitro* metabolikus tulajdonságokban). Amennyiben megoldható, a makroszkópos boncolási eredményeket és a szervtömeg-adatokat a más, ismételt dózisú vizsgálatokban tett megfigyelésekkel összefüggésben kell értékelni. Az utódok növekedésének csökkenését a vizsgált vegyi anyagnak a tej összetételére gyakorolt hatásával kapcsolatban is lehet értelmezni (29).

▼M5

2. kohort (fejlődési neurotoxicitás)

82. Az idegrendszeri és neuropatológiai eredményeket az összes megállapítás összefüggésében kell értelmezni, az adatok bizonyító erején alapuló megközelítést szakértői megítéléssel kombinálva. A viselkedési vagy morfológiai eredmények mintázatait, ha vannak ilyenek, valamint a dózis-válaszra utaló bizonyítékokat meg kell vitatni. A fejlődési neurotoxicitás értékelését bele kell foglalni ebbe a jellemzésbe, beleértve az emberi epidemiológiai vizsgálatokat vagy esettanulmányokat, illetve az állatkísérleteket (pl. toxikokinetikai adatok, szerkezet-hatás információk és egyéb toxicitási vizsgálatok adatai). Az adatok értékelésének tartalmaznia kell a biológiai és a statisztikai szignifikancia diszkusszióját. Az értékelésnek tartalmaznia kell a kapcsolatot – ha van ilyen – a megfigyelt neuropatológiai és viselkedési változások között. A fejlődési neurotoxicitási eredmények értelmezésével kapcsolatos iránymutatásért lásd a B.53 vizsgálati módszert (35) és a Tyl et al., 2008 publikációt (31).

3. kohort (fejlődési immunotoxicitási vizsgálat)

83. Az immunrendszer működésének TDAR-módszerrel (T-sejt dependens antitest válasz) mért gátlását vagy serkentését az összes észrevétel összefüggésében kell értékelni. A TDAR eredményének jelentőségét az immunológiai kapcsolódású mutatókra (pl. a csontvelő cellularitása, a limfoid szövetek tömege és kórszövettana, a limfocita-alcsoportok eloszlása) gyakorolt egyéb hatások is alátámaszthatják. A TDAR által megállapított hatások kevésbé értelmezhetők lehetnek, ha alacsonyabb expozíciós koncentrációknál egyéb toxikus tüneteket figyeltek meg.

84. A reprodukciós és neurotoxicitási eredmények értelmezésével kapcsolatban az OECD 43. iránymutatását kell alkalmazni (26).

SZAKIRODALOM

(1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), 'A Tiered Approach to LIFE Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment', *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69-98.

(2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), 'Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530- 536.

(3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.

(4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), 'Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', International Journal of Toxicology, 24, 87-94.

(5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences*, 49, 1-4.

(6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction – a Literature Survey', *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293-327.

(7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356-369.

▼**M5**

(8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats – overview of the studies', *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1-21.

(9) Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', *Birth Defects Research*, Part B, 68, 408-415.

(10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.

(12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology,* 13: 383-390.

(13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', *Biological Reproduction*, 17, 298-303.

(14) Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', *Methods*, 41, 9-19.

(15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', *Toxicology*, 197, 23-35.

(16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92-108.

(17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', *Journal of Reproduction and Fertility*,54, 103-107.

(18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat'. *Reproductive Toxicology*,5, 39-44.

(19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', *Reproductive Toxicology*, 10, 237- 244.

(20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology*, 6, 267-273.

(21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration', *Journal of Andrology*, 13, 409-421.

(22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology*, 5, 449-458.

▼**M5**

(23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), ‘Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer’, *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

(24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), ‘The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations’, *Journal of Andrology*, 10, 401-415.

(25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), ‘Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants’, *Reproductive Toxicology*, 6, 491-505.

(26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.

(27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), ‘Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility’, *Journal of Andrology*, 8, 330-337.

(28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), ‘A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing – for Today’, *Toxicological Pathology*, 34, 296-313.

(29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), ‘Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components’, *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8-16.

(30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), ‘Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats’, *Environmental health perspectives,* 115(12), 1717-1726.

(31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), ‘Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints’, *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349-381.

(32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.

(33) E melléklet B.43. fejezete: Neurotoxicitási vizsgálat rágcsálókban

(34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(35) E melléklet B.53. fejezete: Fejlődési neurotoxicitási vizsgálat

(36) E melléklet B.54. fejezete: Uterotrofikus biológiai vizsgálat rágcsálókban: gyors szűrővizsgálat az ösztrogénszerű tulajdonságok kimutatására

(37) E melléklet B.55. fejezete: Hershberger bioassay patkányokban: gyors szűrővizsgálat az (anti)androgén tulajdonságok kimutatására

▼**M5**

(38) OECD (2009), Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.

(39) OECD (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.

(40) OECD (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.

▼**M5**

1. függelék

Mérések és megfigyelések a funkcionális megfigyelési vizsgálatban (2.A kohort)

Saját ketrec – Nyílt terület	Manipulálás	Fiziológia
Testtartás	Kivétel könnyűsége	Hőmérséklet
Akaratlan klónusos vagy tónusos görcsök	Kézbevétel könnyűsége	Testtömeg
Szemhéjak bezárása	Izomtónus	Pupillareakció
Szőrmeredezés	Válasz közelítésre	Pupillaméret
Nyálzás	Válasz érintésre	
Könnyezés	Válasz zajra	
Hangadás	Válasz farokcsípésre	
Hátrafelé járás	Felegyenesedési válasz	
Járási rendellenességek	Földre érkező lábak távolsága	
Ébredés	Elülső végtag fogáserőssége	
Sztereotip viselkedés	Hátulsó végtag fogáserőssége	
Bizarr viselkedés		
Foltok		
Légzési rendellenességek		

▼**M5**

2. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Vegyi anyag: egy anyag vagy keverék.

Vizsgált vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

▼M5

B.57. H295R SZTEROIDOGENEZIS-VIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 456. vizsgálati iránymutatásában (2011) leírt módszerrel. Az OECD 1998-ban kiemelt fontosságú tevékenységet indított a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint az endokrin rendszert esetlegesen károsító vegyi anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó új vizsgálati iránymutatások kidolgozása érdekében. Az OECD 2002. évi 'Koncepcionális keret az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok tesztelésére és értékelésére' című dokumentuma öt szintet foglal magában, amelyek mindegyike különböző szintű biológiai komplexitásnak felel meg (1). Az ebben a vizsgálati módszerben leírt *in vitro* H295R szteroidogenezis-vizsgálat (H295R) egy humán adrenocarcinoma sejtvonalat (NCI-H295R sejtek) használ, és 2. szintű 'mechanisztikus adatokat szolgáltató *in vitro* vizsgálatnak' számít, amely szűrési és rangsorolási célokra használható. A vegyi anyagok szteroidogenezisre, különösen a 17β-ösztradiol (E2) és a tesztoszteron (T) termelésére gyakorolt hatásainak szűrésére szolgáló vizsgálat kifejlesztését és szabványosítását egy több lépésből álló folyamat keretében végezték el. A H295R vizsgálatot optimalizálták és validálták (2) (3) (4) (5).

2. A H295R szteroidogenezis-vizsgálat célja olyan vegyi anyagok kimutatása, amelyek befolyásolják az E2 és a T termelését. A H295R-vizsgálat azoknak a xenobiotikumoknak az azonosítására szolgál, amelyek azokat az endogén komponenseket célozzák meg, amelyekből a koleszterintől az E2 és/vagy a T termeléséig tartó sejten belüli biokémiai útvonal felépül. A H295R-vizsgálatnak nem célja azoknak a vegyi anyagoknak az azonosítása, amelyek a hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) tengelyre gyakorolt hatásuk révén befolyásolják a szteroidogenezist. A vizsgálat célja, hogy IGEN/NEM választ adjon egy vegyi anyag azon képessége tekintetében, hogy indukálja vagy gátolja-e a T és az E2 termelését; néhány esetben azonban kvantitatív eredmények is nyerhetők (lásd az 53. és az 54. bekezdést). A vizsgálat eredményei a hormontermelésnek az oldószerkontrollokhoz (SC-k) képest vett relatív változásaként vannak kifejezve. A vizsgálat célja nem az, hogy konkrét mechanisztikus információkat nyújtson a vizsgált vegyi anyag és az endokrin rendszer kölcsönhatásáról. A sejtvonal alkalmazásával azonban végeztek már kutatásokat egyes enzimekre és köztes hormonokra, például a progeszteronra gyakorolt hatások azonosítására vonatkozóan is (2).

3. Az ebben a vizsgálati módszerben használt fogalmak és rövidítések meghatározását a függelék tartalmazza. Az oldatok készítésére, a sejtek tenyésztésére és a vizsgálat különböző aspektusainak végrehajtására vonatkozó utasításokat tartalmazó részletes protokoll 'A tesztoszteron- és az ösztradioltermelés modulátorainak azonosítására szolgáló H295R szteroidogenezis-vizsgálat több laboratóriumban végzett validálása' című OECD-dokumentum I–III. függelékében található (4).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

4. A szteroid nemi hormonok bioszintézisében öt különböző enzim vesz részt, amelyek hat különböző reakciót katalizálnak. A koleszterinnek a citokróm P450 (CYP) koleszterin-oldallánc hasító enzim (CYP11A) által pregnenolonná történő enzimes átalakítása alkotja az első lépést a biokémiai reakciók sorában, amelyek a szteroid végtermékek szintézisében csúcsosodnak ki. A következő két reakció sorrendjétől függően a szteroidogenezis útvonala kétfelé ágazik: a Δ^5-hidroxiszteroid útvonalra és a Δ^4-ketoszteroid útvonalra, amelyek az androsztendion termelésében találkoznak ismét (1. ábra).

5. Az androsztendiont a 17β-hidroxiszteroid-dehidrogenáz (17β-HSD) alakítja tesztoszteronná (T). A tesztoszteron egyszerre köztes és végső hormontermék. Hímekben a T-t az 5α-reduktáz dihidrotesztoszteronná (DHT) alakíthatja át, amely a sejtmembránokban, a sejtmagburokban és az androgén hatás célszöveteinek endoplazmatikus retikulumaiban található meg, például a prosztatában és az ondóhólyagban. A DHT lényegesen hatásosabb androgén, mint a T, és végtermék hormonnak is tekintik. A H295R-vizsgálat nem méri a DHT-t (lásd a 10. bekezdést).

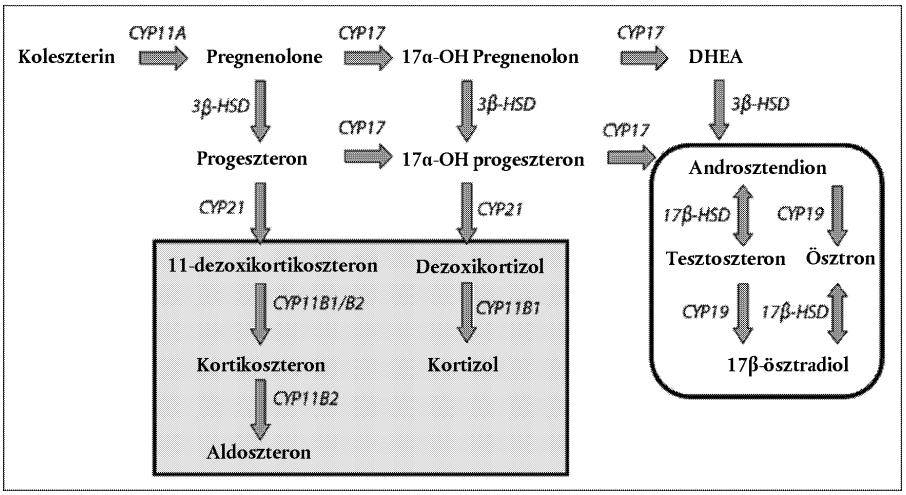
▼M5

6. Az androgén vegyi anyagokat szteroidogén útvonalon ösztrogén vegyi anyagokká átalakító enzim az aromatáz (CYP19). A CYP19 a T-t 17β-ösztradiollá (E2), az androsztendiont pedig ösztronná alakítja át. Az E2-t és a T-t tartják a szteroidogén út végtermék hormonjainak.

7. A CYP17 liáz aktivitásának a köztes szubsztrátumokkal kapcsolatos specifikussága különbözik az egyes fajok között. Emberben az enzim a Δ^5-hidroxiszteroid reakcióút szubsztrátjait (pregnenolon), míg patkányban a Δ^4-ketoszteroid reakcióút szubsztrátjait (progeszteron) részesíti előnyben (19). A CYP17 liáz aktivitásának ezen különbségei megmagyarázhatják a vegyi anyagokra adott válasz különböző fajok közötti egyes eltéréseit, amelyek megváltoztatják az in vivo szteroidogenezist (6). A H295-sejtekről már kimutatták, hogy ezek tükrözik a legjobban az emberi felnőtt mellékvese enzimműködését és szteroidtermelési mintáját (20), de az is ismert, hogy az androgénszintézis Δ^5-hidroxiszteroid és a Δ^4-ketoszteroid útvonalának enzimeit egyaránt megjelenítik (7) (11) (13) (15).

1. ábra

Szteroidképző útvonal a H295R sejtekben



Megjegyzés:

Az enzimek dőlt, a hormonok félkövér betűvel vannak szedve, a nyilak pedig a szintézis irányát jelzik. Szürke háttér jelzi a kortikoszteroid utakat/termékeket. A nemi szteroid utak/termékek bekarikázva láthatók. CYP = citokróm P450; HSD = hidroxiszteroid-dehidrogenáz; DHEA = dehidroepiandroszteron.

8. Az emberi H295R adrenocarcinoma-sejtvonal hasznos in vitro modell a szteroidhormon-szintézisre gyakorolt hatások vizsgálatában (2) (7) (8) (9) (10). A H295R-sejtvonal azokat a géneket fejezi ki, amelyek a szteroidogenezis fentebb említett összes kulcsfontosságú enzimét kódolják (11) (15) (1. ábra). Ez egyedülálló tulajdonság, mert ezeknek a géneknek az *in vivo* expressziója a szövettől és a fejlődési stádiumtól függ, és jellemzően egyik szövet vagy fejlődési szakasz sem fejezi ki a szteroidogenezisben részt vevő összes gént (2). A H295R-sejtek a zónásan differenciálatlan humán magzati mellékvese-sejtek fiziológiai jellemzőivel rendelkeznek (11). A sejtek egy egyedülálló *in vitro* rendszert képviselnek abban a tekintetben, hogy képesek előállítani a felnőtt mellékvesekéregben és az ivarmirigyekben található összes szteroid hormont, lehetővé téve a kortikoszteroidok és a szteroid nemi hormonok, mint például az androgének és az ösztrogének szintézisére gyakorolt hatások vizsgálatát egyaránt, bár a vizsgálat validálása csak a T és az E2 kimutatására történt meg. A vizsgálati rendszer által rögzített, a T- és az E2-termelés módosulásának formájában megnyilvánuló változások a vizsgált vegyi anyagok és a H295R-sejtek által kifejezett szteroidogén funkciók közötti különböző kölcsönhatások következményei lehetnek. Ezek közé tartozik a génexpresszió, a szintézis vagy a szteroid hormonok előállításában,

▼M5

átalakításában vagy eliminációjában részt vevő enzimek funkciójának modulációja (12) (13) (14). A hormontermelés gátlása bekövetkezhet a reakcióútban szereplő enzimhez való közvetlen kompetitív kötődés, a kofaktorokra – mint például az NADPH (nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát) és a cAMP (ciklikus adenozin-monofoszfát) – gyakorolt hatás és/vagy a szteroidmetabolizmus növekedése vagy a szteroidogenezis útvonalában szereplő bizonyos enzimek génexpressziójának gátlása révén. Míg a gátlás a hormontermelésben szerepet játszó közvetlen vagy közvetett folyamatoknak egyaránt a függvénye lehet, az indukció tipikusan közvetett jellegű, mint például a kofaktorok, mint a NADPH és a cAMP befolyásolása (például a forskolin esetében), vagy a szteroidmetabolizmus csökkentése (13), illetve a szteroidogén génexpresszió feljebb szabályozása.

9. A H295R-vizsgálatnak számos előnye van:

— egyaránt lehetővé teszi a T- és E2-termelés növekedésének és csökkenésének kimutatását,

— lehetőséget biztosít a vegyi anyag sejtek életképességére gyakorolt lehetséges hatásának, citotoxicitásának közvetlen értékelésére. Ez egy fontos tulajdonság, mivel lehetővé teszi a citotoxicitás miatti hatások megkülönböztetését a vegyi anyagok és a szteroidogén utak közötti közvetlen kölcsönhatások alapján fellépő hatásoktól, ami nem lehetséges a több, különböző érzékenységű és funkciójú sejttípusból álló szöveti explantátum rendszerekben,

— nem igényli állatok használatát,

— a H295R sejtvonal a kereskedelemben kapható.

10. A vizsgálat alapvető korlátai az alábbiak:

— A vizsgálat metabolikus képessége nem ismert, de valószínűleg meglehetősen korlátozott, ezért azokat a vegyi anyagokat, amelyeket metabolikusan aktiválni kell, a vizsgálati eljárás valószínűleg nem fogja érzékelni.

— A H295R a mellékveséből származó szövetként rendelkezik a glüko- és mineralokortikoidok, illetve a nemi hormonok termelésére képes enzimekkel is, ezért a glüko- és mineralokortikoidok termelésére kifejtett hatások befolyásolhatják a T-nek és az E2-nek a vizsgálatban megfigyelhető szintjét is.

— A vizsgálat nem méri a DHT-t és ezért nem várható, hogy kimutassa az 5α-reduktáz gátló vegyi anyagokat, amelyek esetében a Hershberger assay-t (16) lehet használni.

— A H295R-vizsgálat nem fogja érzékelni azokat a vegyi anyagokat, amelyek a hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely (HPG) befolyásolása révén zavarják a szteroidogenezist, mivel azt csak ép állatokban lehet vizsgálni.

A VIZSGÁLAT ELVE

11. A vizsgálat célja a T- és E2-termelést befolyásoló vegyi anyagok kimutatása. A T egyúttal egy köztes termék is az E2 előállításához vezető úton. A vizsgálat képes észlelni azokat a vegyi anyagokat, amelyek tipikusan gátolják vagy indukálják a szteroidogenezis-útvonal enzimeit.

▼M5

12. A vizsgálatot rendszerint standard sejttenyésztési körülmények között, 24-lyukú szövettenyésztő lemezeken végezzük. Alternatívaként egyéb lemezméreteket is lehet használni a vizsgálat elvégzésére, de a sejttelepítés körülményeit és a kísérleti feltételeket megfelelően módosítani kell a teljesítménykritériumoknak való megfelelés érdekében.

13. A többlyukú lemezen történt 24 órás akklimatizációs időszak után a sejteket 48 órán keresztül a vizsgált vegyi anyag hét koncentrációjának tesszük ki legalább három példányban. Negatív és pozitív kontrollként oldószert, egy ismert hormoninhibitort és egy hormontermelést indukáló anyagot futtatunk rögzített koncentrációban. Az expozíciós idő végén minden lyukból eltávolítjuk a táptalajt. Az egyes lyukakban lévő sejtek életképességét a táptalaj eltávolítása után azonnal elemezzük. Különböző módszerekkel lehet mérni a hormonok koncentrációját a táptalajban, beleértve a kereskedelmi forgalomban kapható hormonmérő készleteket és/vagy a műszeres technikákat, mint például a folyadékkromatográfia-tömegspektrometriát (LC-MS). Az adatokat az oldószer kontrollhoz és a megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentrációhoz (LOEC) viszonyított valahányszoros változásban fejezzük ki. Ha a vizsgálat eredménye negatív, a legnagyobb vizsgált koncentrációt megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációként (NOEC) jegyzőkönyvezzük. A vegyi anyag szteroidogenezist befolyásoló képességére vonatkozó következtetést legalább két független tesztre kell alapozni. Az első teszt dózisbehatároló vizsgálatként funkcionálhat, adott esetben a 2. és 3. vizsgálat koncentrációinak kiigazításával, ha oldhatósági vagy citotoxicitási problémák lépnek fel, vagy ha a vegyi anyag aktivitása a vizsgált koncentrációtartomány végén helyezkedik el.

SEJTKULTÚRA ELJÁRÁS

Sejtvonal

14. Az NCI-H295R sejteket az Amerikai Típusú Sejtkultúra-Gyűjteménytől (American Type Kultúra Collections – ATCC) anyagátadási szerződés (Material Transfer Agreement – MTA) aláírásával lehet megvásárolni ([1]).

Bevezetés

15. Mivel az E2-termelő kapacitás a sejtek életkorának/passzálások számának növekedésével változik (2), a sejteket használat előtt egy adott protokoll szerint kell tenyészteni, és fel kell jegyezni a sejtek kiolvasztása óta történt passzálások számát, valamint annak az passzálásnak a sorszámát is, amelyen a sejteket lefagyasztottuk és folyékony nitrogén tárolóba helyeztük. Az első szám a passzálások számát jelzi, a második szám pedig leírja annak a passzálásnak a számát, amelyen a sejteket lefagyasztottuk és betároltuk. Például, azokat a sejteket, amelyeket az ötödik passzálás után fagyasztottunk le, majd felolvasztottunk, és ismételt tenyésztést követően háromszor felosztottunk (4 passzálás, a frissen felolvasztott sejteket 1. passzálásnak tekintve), 4.5 passzálásként címkéznénk fel. A számozási rendszer egy példáját a validálási jelentés I. függeléke szemlélteti (4).

16. A kiegészített és fagyasztó táptalajok alapjaként alapközeget használunk. A kiegészített táptalaj a sejttenyésztés szükséges eleme. A fagyasztó táptalajt kifejezetten úgy tervezték meg, hogy lehetővé tegye a sejtek hatásmentes lefagyasztását a hosszú távú tárolás céljára. Használat előtt a Nu-szérumot (vagy az olyan összehasonlítható tulajdonságokkal rendelkező szérumot, amelyről kimutatták, hogy a vizsgálati teljesítményre és minőségellenőrzésre (QC) vonatkozó követelményeknek megfelelő adatokat produkál) – amely a kiegészített táptalajok alkotórésze – analizálni kell a háttér T- és E2-koncentráció szempontjából. Az oldatok előkészítését a validálási jelentés II. függeléke írja le (4).

([1]) ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, [http://www.lgcstandards-atcc.org/].

▼M5

17. Az eredeti ATCC-tételből származó H295R-sejttenyészet megkezdését követően a sejteket öt passzáláson keresztül kell tenyészteni (azaz a sejteket 4-szer kell felosztani). Az ötödik passzázs sejtjeit ezután folyékony nitrogénben lefagyasztjuk tárolás céljából. A sejtek lefagyasztása előtt a negyedik passzázs sejtjeiből vett mintát lefuttatjuk egy QC-lemezen (lásd a 36. és 37. bekezdést) annak ellenőrzése céljából, hogy a hormonok termelődése és a pozitív kontroll vegyi anyagokra adott válasz megfelel-e a vizsgálat minőségbiztosítási kritériumainak, amelyeket az 5. táblázat tartalmaz.

18. A H295R-sejteket tenyészteni kell, le kell fagyasztani és folyékony nitrogénben kell tárolni annak érdekében, hogy folyamatosan rendelkezésre álljanak megfelelő passzálású/korú sejtek a tenyésztés és a használat céljára. Egy új ([1]) vagy fagyasztott ([2]) sejttétel tenyésztésbe vétele utáni passzálások maximális száma, amely még elfogadható a H295R-vizsgálatban való használatra, nem haladhatja meg a 10-et. Például az 5. passzázsban lefagyasztott tételből származó sejtkultúrák passzálásainak elfogadható száma 4.5-10.5 lenne. Az ezekből a fagyasztott tételekből indult sejtek esetében a 19. bekezdésben leírt eljárást kell követni. Ezeket a sejteket legalább négy (4) további passzáláson át kell tenyészteni (passzázs-szám 4,5) a tesztelésben való használatot megelőzően.

Sejtek indítása fagyasztott állományból

19. A sejtek fagyasztott állományból történő indítására vonatkozó eljárást kell alkalmazni, amikor egy új sejttételt tenyésztés és tesztelés céljából kiemelünk a folyékony nitrogén tartályból. Ennek az eljárásnak a részleteit a validálási jelentés III. függeléke tartalmazza (4). A sejteket eltávolítjuk a folyékony nitrogén tartályból, gyorsan felolvasztjuk, kiegészített táptalajban egy centrifugacsőbe helyezzük, szobahőmérsékleten centrifugáljuk, újraszuszpendáljuk a kiegészített táptalajban, majd átvisszük egy sejttenyésztő edénybe. A táptalajt a következő napon le kell cserélni. A H295R-sejteket 37 °C-on inkubátorban tenyésztjük 5 % CO_2-t tartalmazó levegő atmoszférában, és a táptalajt hetente 2-3 alkalommal megújítjuk. Amikor a sejtkultúra körülbelül 85–90 %-ban egybefolyik, akkor meg kell osztani. A sejtek megosztására azért van szükség, hogy biztosítsuk a sejtek egészségét és növekedését, és hogy fenntartsuk a sejtkultúrát a biológiai tesztek elvégzésére. A sejteket háromszor átöblítjük foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS, Ca^{2+} Mg^{2+} nélkül), és felszabadítjuk a sejttenyésztő edényből egy megfelelő leválasztó enzim, például tripszin PBS-ben (Ca^{2+} Mg^{2+} nélkül) való hozzáadásával. Közvetlenül azután, hogy a sejtek leválnak a sejttenyésztő edényről, az enzimes eljárást le kell állítani úgy, hogy kiegészített táptalajt adunk hozzá a kultúrához az enzimes kezeléshez használt térfogat háromszoros mennyiségében. A sejteket behelyezzük egy centrifugacsőbe, szobahőmérsékleten centrifugáljuk, a felúszót elöntjük, és a sejtpelletet újraszuszpendáljuk kiegészített táptalajban. Megfelelő mennyiségű sejtoldatot áthelyezünk az új sejttenyésztő edénybe. A sejtoldat mennyiségét úgy kell beállítani, hogy a sejtek 5–7 napon belül összefolyjanak. Az ajánlott másodlagos tenyésztési arány 1:3-1:4. A lemezt gondosan fel kell címkézni. A sejtek most már készen állnak a vizsgálatban való felhasználásra és a felesleges sejteket le kell fagyasztani folyékony nitrogénben a 20. bekezdésben leírtak szerint.

([1]) Az ‘új tétel’ kifejezés az ATCC-től kapott friss sejttételt jelenti.

([2]) A ‘fagyasztott tétel’ kifejezés olyan sejteket jelent, amelyeket már korábban tenyésztettek és lefagyasztottak egy ATCC-től eltérő laboratóriumban.

▼M5

A H295R-sejtek lefagyasztása (a sejtek előkészítése a folyékony nitrogénben való tárolásra)

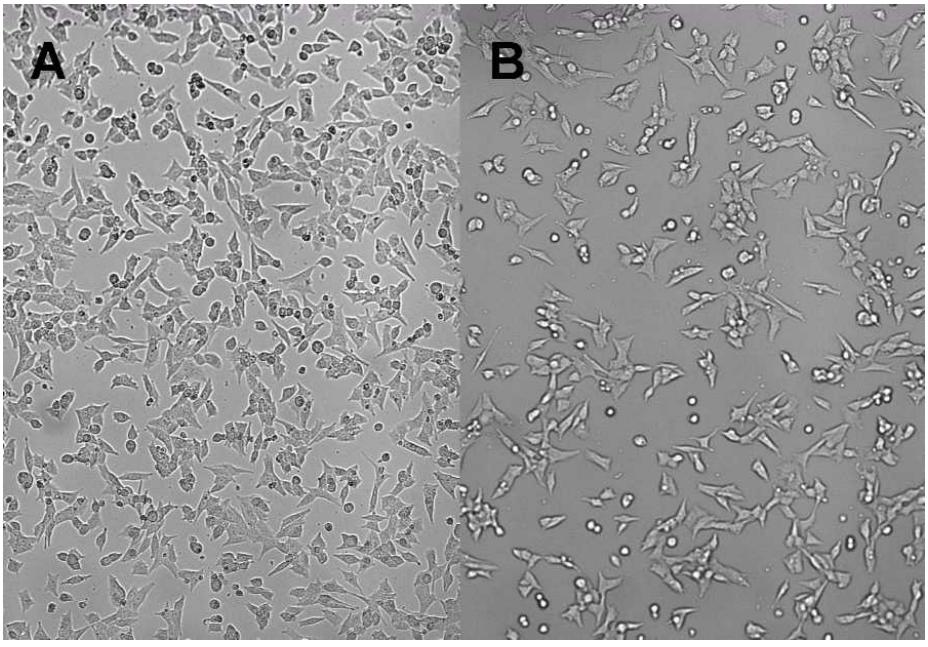
20. A H295R-sejtek fagyasztásra történő előkészítése érdekében a sejtek felosztására vonatkozó fentiekben leírt eljárást kell követni a sejtpelletnek a centrifugacső alján történő újraszuszpendálásáig. Itt a sejtpelletet a fagyasztó táptalajban kell újraszuszpendálni. Az oldatot átvisszük egy megfelelően felcímkézett kriogén fiolába, és – 80 °C hőmérsékleten 24 órán keresztül fagyasztjuk, majd a kriogén fiolát folyékony nitrogénbe helyezzük tárolás céljából. Ennek az eljárásnak a részleteit a validálási jelentés III. függeléke tartalmazza (4).

A sejtek lemezre ültetése és előzetes inkubálása tesztelés céljából

21. Az, hogy a 19. bekezdésben körvonalazott módon előkészített 24-lyukú lemezekből mennyire lesz szükség, a vizsgálandó vegyi anyagok számától és a tenyésztőedényekben lévő sejtek konfluenciájától függ. Általános szabály, hogy a 80–90 %-ban összefolyó sejtek egy sejttenyésztő edénye (75 cm^2) elegendő mennyiségű sejtet szolgáltat 1,5 (24-lyukú) lemezhez 200 000-300 000 sejt/ml táptalaj célsűrűség mellett, aminek eredményeként körülbelül 50–60 %-os összefolyás érhető el a lyukakban 24 óra alatt (2. ábra). Általában ez az optimális sejtsűrűség a hormontermeléshez a vizsgálatban. Nagyobb sűrűség esetén a T- és E2-termelési minták megváltoznak. A vizsgálat első alkalommal történő elvégzése előtt ajánlott tesztelni a 200 000 és 300 000 sejt/ml közötti különböző ültetési sűrűségeket, és a lyukakban 24 óra alatt 50–60 %-os összefolyást eredményező sűrűséget kell kiválasztani a további kísérletekhez.

2. ábra

24-lyukú tenyésztőlemezen 24 óra után 50 %-os ültetési sűrűségű H295R-sejtek mikrofotogramja a lyuk szélén (A) és közepén (B)



22. A táptalajt lepipettázzuk a sejttenyésztő edényből, és a sejteket 3-szor átöblítjük steril PBS-sel (Ca^{2+} Mg^{2+} nélkül). Enzimoldatot (PBS-ben) adunk hozzá, amely elválasztja a sejteket a sejttenyésztő edénytől. A sejtek leválására biztosított megfelelő idő után az enzimes eljárást le kell állítani úgy, hogy kiegészített táptalajt adunk hozzá a kultúrához az enzimes kezeléshez használt térfogat háromszoros mennyiségében. A sejteket behelyezzük

▼M5

egy centrifugacsőbe, szobahőmérsékleten centrifugáljuk, a felülúszót elöntjük, és a sejtpelletet kiegészített táptalajban újraszuszpendáljuk. A sejtsűrűséget például hemocitométerrel vagy sejtszámlálóval kiszámítjuk. A sejtoldatot fel kell hígítani a kívánt ültetési sűrűségre és alaposan össze kell keverni a homogén sejtsűrűség biztosítása érdekében. A sejteket 1 ml sejtoldat/lyuk mennyiségben kell ültetni, illetve a lemezeket és lyukakat fel kell címkézni. A beoltott lemezeket 37 °C-on 5 % CO_2-t tartalmazó levegő atmoszférában 24 órán át inkubáljuk, hogy lehetővé tegyük a sejteknek a lyukakban való megtapadását.

MINŐSÉG-ELLENŐRZÉSI KÖVETELMÉNYEK

23. Rendkívül fontos, hogy az adagolás során az oldatokból és mintákból pontos mennyiségeket helyezzünk el a lyukakban, mivel ezek a térfogatok határozzák meg azokat a koncentrációkat, amelyeket a vizsgálat eredményeinek számítása során használunk.

24. A sejtkultúra megkezdése és bármely azt követő vizsgálat előtt minden laboratóriumnak bizonyítania kell a hormonmérési rendszerének érzékenységét (29–31. bekezdés).

25. Ha ellenanyag-alapú hormonmérési vizsgálatokat tervezünk használni, a vizsgálandó vegyi anyagokat a vizsgálat megkezdése előtt meg kell vizsgálni, hogy zavarják-e a 32. bekezdésben körvonalazott, a T és E2 számszerűsítésére használt mérési rendszert.

26. A vizsgálathoz ajánlott oldószer a DMSO. Ha alternatív oldószert alkalmazunk, akkor a következőket kell meghatározni:

— a vizsgált vegyi anyag, a forskolin és a prokloráz oldhatósága az oldószerben, valamint

— citotoxicitás az oldószer koncentrációjának függvényében.

Ajánlott, hogy a maximálisan megengedhető oldószer-koncentráció ne haladja meg az oldószer legkevésbé citotoxikus koncentrációjának 10-szeres hígítását.

27. A vizsgálat először történő elvégzése előtt a laboratóriumnak el kell végeznie a 33–35. bekezdésben leírt minősítő kísérletet annak igazolására, hogy a laboratórium képes fenntartani és előállítani a kémiai vizsgálatokhoz szükséges megfelelő sejtkultúrát és kísérleti körülményeket.

28. Ha új sejttétellel kívánunk elindítani egy tesztelést, az új tétel használata előtt le kell futtatni egy kontroll lemezt a sejtek teljesítményének értékelése céljából a 36. és 37. bekezdésben leírtak szerint.

A hormonmérő rendszer teljesítménye

A módszer érzékenysége, pontossága, precizitása és keresztreaktivitás a mintamátrixszal

29. Minden laboratórium az általa kiválasztott hormonmérési rendszert használhatja a H295R-sejtek T- és E2-termelésének elemzéséhez, amíg az megfelel a teljesítménykritériumoknak, beleértve a meghatározási határt (LOQ) is. Névlegesen ez 100 pg/ml a T és 10 pg/ml az E2 esetében, amelyek a validálási vizsgálatokban megfigyelt bazális hormonszinteken alapulnak. Azonban magasabb vagy alacsonyabb szintek is megfelelőek lehetnek attól függően, hogy a vizsgálatot végző laboratórium milyen bazális hormonszintet ért el. A QC-lemezek és a tesztek futtatásának megkezdése előtt a laboratóriumnak belső hormon kontrollal kezelt kiegészített táptalajok elemzésével bizonyítania kell, hogy a használandó hormonvizsgálat kellő pontossággal és precizitással tudja mérni a hormonkoncentrációkat a kiegészített táptalajban

▼M5

ahhoz, hogy megfeleljen az 1. és 5. táblázatban meghatározott QC-kritériumoknak. A kiegészített táptalajba az egyes hormonoknak legalább három koncentrációját kell bevinni (pl. 100, 500 és 2 500 pg/ml T, 10, 50 és 250 pg/ml E2; vagy a választott hormonmérési rendszer kimutatási határain alapuló legalacsonyabb koncentráció használható a T és E2 legalacsonyabb koncentrációjaként) és analizálni. A nem extrahált minták mért hormonkoncentrációinak a névleges koncentrációkhoz képest 30 %-on belül kell lennie, és az azonos minta ismételt mérései közötti variáció nem haladhatja meg a 25 %-ot (további QC-kritériumokért lásd még a 8. táblázatot). Ezeknek a QC-kritériumoknak a teljesülése esetén azt feltételezzük, hogy a kiválasztott hormonmérési vizsgálat kellőképpen pontos, precíz, és nem ad olyan keresztreakciót a táptalaj komponenseivel (mintamátrix), hogy az jelentősen befolyásolná a vizsgálat eredményét. Ebben az esetben nincs szükség a minták hormonmérés előtti extrakciójára.

30. Abban az esetben, ha az 1. és 8. táblázatban foglalt QC-kritériumok nem teljesülnek, az jelentős mátrixhatásra utalhat, és a kísérletet extrahált kezelt táptalajjal kell elvégezni. A extrakciós eljárás egy példáját a validálási jelentés II. függeléke szemlélteti (4). A hormonkoncentráció méréseit az extrahált mintákon három példányban kell elvégezni. ([1]) Ha kimutatható, hogy a táptalaj komponensei az extrahálás után nem zavarják a hormonkimutatási módszert a QC-kritériumokban meghatározottak szerint, minden további kísérleteket extrahált minták felhasználásával kell elvégezni. Ha az extrahálás után a QC-kritériumok nem teljesülnek, a felhasznált hormonmérő rendszer nem alkalmas a H295R szteroidogenezis vizsgálat céljára, és alternatív hormonkimutatási módszert kell használni.

Standard görbe

31. Az oldószer kontrollok (SC-k) hormonkoncentrációjának a standard görbe lineáris részén belül kell lennie. A legelőnyösebb az, ha az SC-értékek közel esnek a lineáris rész közepéhez annak érdekében, hogy a hormonszintézis indukciója és inhibíciója mérhető legyen. A táptalajok (vagy extraktok) mérendő hígításait ennek megfelelően kell kiválasztani. A lineáris kapcsolatot megfelelő statisztikai megközelítés segítségével kell meghatározni.

Kémiai interferencia teszt

32. Ha ellenanyag-alapú vizsgálatokat, például enzimkötött immunoszorbens vizsgálatot (ELISA) és radioimmun vizsgálatot (RIA) fognak a hormonok mérésére használni, a vegyi anyagok tényleges tesztelésének megkezdése előtt a vegyi anyagok mindegyikét meg kell vizsgálni a használni tervezett hormonmérési rendszerrel való lehetséges interferencia tekintetében (validálási jelentés III. függeléke (4)), mert néhány vegyi anyag zavarhatja ezeket a vizsgálatokat (17). Ha a hormonanalízis a T és/vagy E2 bazális hormontermelés ≥ 20 %-ának megfelelő interferencia előfordulását mutatja ki, le kell futtatni egy kémiai hormonvizsgálati interferencia tesztet (például a validálási jelentés (4) III. függelékének 5.0. fejezetében leírt tesztet) a vizsgált vegyi anyag törzsoldatának összes hígításán annak a küszöbdózisnak a

([1]) *Megjegyzés:* Ha extrakcióra van szükség, minden kivonattal három párhuzamos mérést végzünk. Minden mintát csak egyszer extrahálunk.

▼M5

meghatározására, amely mellett jelentős (≥ 20 %) interferencia lép fel. Ha az interferencia kisebb mint 30 %, az eredményeket korrigálni lehet az interferenciával. Ha az interferencia meghaladja a 30 %-ot, az adatok érvénytelenek, és az adott koncentráció adatait el kell vetni. Ha egy vizsgált vegyi anyag több mint egy nem citotoxikus koncentráció mellett is jelentős interferenciát mutat a hormonmérési rendszerrel, másik hormonmérési rendszert kell használni. A szennyező vegyi anyagok által kiváltott interferencia elkerülése érdekében ajánlott, hogy a hormonokat alkalmas oldószerrel extraháljuk a táptalajból, a lehetséges módszerek megtalálhatók validálási jelentésben (4).

1. táblázat

A hormonmérő rendszer teljesítménykritériumai

Paraméter	Kritérium
A mérési módszer érzékenysége	Meghatározási határ (LOQ) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ([a])
A hormonextrakció hatékonysága (kizárólag akkor, ha extrakcióra van szükség)	A bevitt hormonmennyiség átlagos visszanyerési aránya (a három mérés alapján) nem térhet el több mint 30 %-ban a bevitt mennyiségtől.
Kémiai interferencia (kizárólag az antitest-alapú rendszerek esetében)	Nem fordul elő jelentős (az adott hormon bazális hormontermelése ≥ 30 %-ának megfelelő) keresztreaktivitás a sejtek által termelt semelyik hormonnal ([b]) ([c])

([a]) *Megjegyzés*: A módszer mérési határértékei az 5. táblázatban megadott bazális hormontermelési értékeken alapulnak és teljesítményalapúak. Ha magasabb bazális hormontermelést lehet elérni, akkor a határérték is nagyobb lehet.

([b]) Egyes T- és E2-antitestek nagyobb százalékban is keresztreakcióba léphetnek az androsztendionnal és az ösztronnal. Ilyen esetekben nem lehet pontosan meghatározni a 17β-HSD-re gyakorolt hatásokat. Az adatok azonban továbbra is hasznos információt nyújthatnak az ösztrogén- vagy androgéntermelésre gyakorolt hatásokról általában. Ilyen esetekben az adatokat androgén/ösztrogén válaszban kell kifejezni E2 és T helyett.

([c]) Ezek a következők: koleszterin, pregnenolon, progeszteron, 11-dezoxikortikoszteron, kortikoszteron, aldoszteron, 17α-pregnenolon, 17α-progeszteron, dezoxikortizol, kortizol, DHEA, androsztendion, ösztron.

Laboratóriumi jártassági teszt

33. Ismeretlen vegyi anyagok vizsgálata előtt a laboratóriumnak egy laboratóriumi jártassági teszt lefuttatásával kell demonstrálnia, hogy képes előállítani és fenntartani a megfelelő sejtkultúrát és a vizsgálat sikeres lebonyolításához szükséges vizsgálati körülményeket. Mivel egy vizsgálat végrehajtása közvetlenül összefügg a vizsgálatot végző laboratóriumi személyzettel, ezeket az eljárásokat részlegesen meg kell ismételni, ha változás következik be a laboratóriumi személyzetben.

34. Ezt a jártassági tesztet a 38–40. bekezdésben felsoroltakkal megegyező feltételek mellett kell elvégezni, a sejteket erős, közepes és gyenge induktorok és inhibitorok 7 növekvő koncentrációjának, valamint egy negatív vegyi anyagnak kitéve (lásd a 2. táblázatot). Pontosabban, a vizsgálandó vegyi anyagok közé tartozik az erős induktor forskolin (CAS-szám: 66575-29-9), az erős inhibitor prokloráz (CAS-szám: 67747-09-5), a mérsékelt induktor

▼M5

atrazin (CAS-szám: 1912-24-9), a közepes inhibitor aminoglutetimid (CAS-szám: 125-84-8), a gyenge induktor (E2-termelés) és gyenge inhibitor (T-termelés) biszfenol-A (CAS-szám: 80-05-7), és a negatív vegyi anyag humán chorion-gonadotropin (HCG) (CAS-szám: 9002-61-3), amint azt a 2. táblázat mutatja. Külön lemezeket futtatunk az egyes vegyi anyagokra a 6. táblázatban bemutatott sémának megfelelően. A napi futtatásokba is be kell illeszteni egy QC-lemezt (4. táblázat, 36–37. bekezdés) a jártassági tesztanyagok részére.

2. táblázat

Jártassági tesztanyagok és expozíciós koncentrációk

Jártassági tesztanyag	Vizsgálati koncentrációk [μM]
Prokloráz	0 ([a]), 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskolin	0 ([a]), 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30
Atrazin	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutetimid	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Biszfenol-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]) Oldószer (DMSO) kontroll (0), 1 μl DMSO/lyuk

A H295R jártassági tesztanyagoknak való expozícióját 24-lyukú lemezen kell elvégezni a laboratóriumi jártassági teszt során. Az adagolás μM-ban van megadva a vizsgált vegyi anyagok valamennyi dózisa esetében. A dózisokat DMSO-hoz kell hozzáadni 0,1 térfogatszázalék arányban lyukanként. Az összes tesztkoncentrációt három lyukban kell vizsgálni (6. táblázat). Az egyes vegyi anyaghoz külön lemezeket kell futtatni. Minden napi futtatásba egy QC-lemezt is be kell illeszteni.

35. A sejtek életképességének és a hormonoknak az elemzését a 42–46. bekezdésben előírtak szerint kell elvégezni. A küszöbértéket (megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció, LOEC) és a besorolásra vonatkozó döntést jegyzőkönyvezni kell, és össze kell hasonlítani a 3. táblázatban szereplő értékekkel. Az adatok elfogadhatónak tekinthetők, ha megfelelnek a 3. táblázatban foglalt LOEC-értékeknek és besorolási döntésnek.

3. táblázat

A jártassági tesztanyagok küszöbértékei (LOEC) és besorolási döntései

	CAS-szám	LOEC [μM]		Besorolási döntés	
		T	E2	T	E2
Prokloráz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ([a])(Indukció)	+ (Inhibíció)
Forskolin	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (Indukció)	+ (Indukció)
Atrazin	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Indukció)	+ (Indukció)
Aminoglutetimid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (Inhibíció)	+ (Inhibíció)

▼M5

	CAS-szám	LOEC [μM]		Besorolási döntés	
		T	E2	T	E2
Biszfenol-A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (Inhibíció)	+ (Indukció)
HCG	9002-61-3	n/a	n/a	Negatív	Negatív

([a]) +, pozitív
n/a: nem alkalmazható, mivel a negatív kontroll nem citotoxikus koncentrációjának való expozíció után nem történhet változás.

Minőség-ellenőrzési lemez

36. A minőség-ellenőrzési (QC) lemezt a H295R-sejtek standard tenyésztési körülmények közötti teljesítményének ellenőrzésére, valamint az oldószeres kontrollokban, a pozitív és negatív kontrollokban mért hormonkoncentrációk, valamint az egyéb QC-mérések történeti adatbázisának létrehozására használjuk.

— A H295R-sejtek teljesítményét QC-lemez használatával kell értékelni minden egyes új ATCC tétel esetében vagy ha egy korábban lefagyasztott sejtállományt első alkalommal használunk, kivéve, ha a laboratórium jártassági tesztjét (32-34. bekezdés) ezzel a sejttétellel futtattuk le.

— A QC-lemez teljes értékelést ad a vizsgálati feltételekről (pl. a sejtek életképessége, oldószeres kontrollok, negatív és pozitív kontrollok, valamint intra- és inter-assay variabilitás) a vegyi anyagok vizsgálata során, és azt minden tesztfuttatásba be kell építeni.

37. A QC-vizsgálatra 24-lyukú lemezen kerül sor, és ugyanazokat az inkubációs, adagolási, sejt életképességi/citotoxicitási, hormonextrakciós és hormonelemzési eljárásokat követi, mint amelyeket a 38–46. bekezdés a vegyi anyagok tesztelésére leír. A QC-lemez vakpróbákat, oldószeres kontrollokat, egy ismert induktor két koncentrációját (forskolin, 1 és 10 μM), valamint az E2- és T-szintézis egy ismert inhibitorának két koncentrációját (prokloráz, 0,1 és 1 μM) is tartalmazza. Ezen túlmenően pozitív kontrollként MeOH-t használunk kiválasztott lyukakban az életképességi/citotoxicitási vizsgálatban. A lemezelrendezés részletes leírása a 4. táblázatban található. A QC-lemezen teljesítendő kritériumokat az 5. táblázat tartalmazza. A T és az E2 minimális bazális hormon termelését mind az oldószer kontrollban, mind a vakpróbákban teljesíteni kell.

4. táblázat

A minőség-ellenőrzési lemez elrendezése a nem kezelt és az E2- és T-termelés ismert gátlóinak (PRO = prokloráz) és stimulánsainak (FOR = forskolin) kitett H295R-sejtek teljesítményének vizsgálatához. Az expozíciós kísérlet befejezése és a táptalaj eltávolítása után 70 %-os metanol oldatot adunk hozzá minden MeOH-lyukhoz, hogy pozitív kontrollként szolgáljanak a citotoxicitási vizsgálat során (a citotoxicitási vizsgálatot lásd a validálási jelentés III. függelékben (4))

	1	2	3	4	5	6
A	Vakpróba ([a])	Vakpróba ([a])	Vakpróba ([a])	Vakpróba ([a]) (+ MeOH) ([b])	Vakpróba ([a]) (+ MeOH) ([b])	Vakpróba ([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	FOR 0,1 μM	FOR 0,1 μM	FOR 0,1 μM
D	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM

([a]) A vakpróbák sejtjeihez csak táptalajt adunk (azaz nincs oldószer).
([b]) A metanolt (MeOH) az expozíció megszüntetése és a táptalajnak ezekből a lyukakból történt eltávolítása után adjuk hozzá.
([c]) DMSO oldószeres kontroll (1 μl/lyuk).

5. táblázat

A minőség-ellenőrzési lemez teljesítménykritériumai

	T	E2
A hormon bazális termelődése az oldószeres kontrollban (SC)	Az LOQ ≥ 5-szöröse	Az LOQ ≥ 2,5-szöröse
Indukció (10 μM forskolin)	Az SC ≥ 1,5-szöröse	Az SC ≥ 7,5-szöröse
Inhibíció (1μM prokloráz)	Az SC ≤ 0,5-szöröse	Az SC ≤ 0,5-szöröse

VEGYIANYAG-EXPOZÍCIÓS ELJÁRÁS

38. Az előinkubált sejteket eltávolítjuk az inkubátorból (21. bekezdés) és az adagolást megelőzően mikroszkóp alatt ellenőrizzük, hogy jó állapotban vannak-e (tapadás, morfológia).

39. A sejteket biológiai biztonsági fülkében helyezzük el, a kiegészített táptalajt eltávolítjuk és új kiegészített táptalajjal váltjuk fel (1 ml/lyuk). Ehhez a vizsgálati módszerhez oldószerként lehetőleg DMSO-t kell alkalmazni. Ha azonban más oldószer használata indokolt, azt tudományos érvekkel kell alátámasztani. A sejteket a vizsgált vegyi anyagnak úgy tesszük ki, hogy 1 ml kiegészített táptalajhoz (lyuk térfogata) hozzáadjuk a DMSO-ban feloldott megfelelő törzsoldat 1 μl-ét (lásd a validálási jelentés II. függelékét (4)). Ez azt eredményezi, hogy a DMSO végső koncentrációja a lyukakban 0,1 % lesz. A megfelelő elkeveredéshez általában előnyös, ha a vizsgált vegyi anyag DMSO-ban feloldott megfelelő törzsoldatát összekeverjük a kiegészített táptalajjal, hogy megkapjuk minden egyes dózis kívánt végső koncentrációját, és a keveréket közvetlenül a régi táptalaj eltávolítása után hozzáadjuk az egyes lyukakhoz. Ha ezt az opciót használjuk, a DMSO koncentrációja (0,1 %) konzisztens marad az összes lyukban. A két legnagyobb koncentrációt tartalmazó lyukat sztereomikroszkóp segítségével vizuálisan értékeljük csapadékok képződése vagy a zavarosság jelei szempontjából, amelyek a vizsgált vegyi anyag nem komplett oldhatóságára utalnak. Ha ilyen körülmények (elfelhősödés, csapadék képződése) figyelhetők meg, a következő kisebb koncentrációt tartalmazó lyukakat is megvizsgáljuk (és így tovább), és azokat a koncentrációkat, amelyek nem teljesen mennek oldatba, ki kell zárni a további értékelésből és elemzésből. A lemezt visszahelyezzük az inkubátorba, ahol 37 °C-on 5 % CO_2-t tartalmazó levegő atmoszférában 48 órán keresztül inkubáljuk. A vizsgált vegyi anyag lemez elrendezését a 6. táblázat mutatja. Az 1–7. törzsoldatok a vizsgált vegyi anyag növekvő dózisainak elhelyezését mutatják.

▼M5

6. táblázat

Adagolási séma a H295R-sejtek vizsgált vegyi anyaggal való expozíciójához 24-lyukú lemezen

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	4. törzsoldat	4. törzsoldat	4. törzsoldat
B	1. törzsoldat	1. törzsoldat	1. törzsoldat	5. törzsoldat	5. törzsoldat	5. törzsoldat
C	2. törzsoldat	2. törzsoldat	2. törzsoldat	6. törzsoldat	6. törzsoldat	6. törzsoldat
D	3. törzsoldat	3. törzsoldat	3. törzsoldat	7. törzsoldat	7. törzsoldat	7. törzsoldat

40. 48 óra elteltével az expozíciós lemezeket eltávolítjuk az inkubátorból, és mikroszkóp alatt minden lyukban ellenőrizzük a sejtek állapotát (tapadás, morfológia, összefolyás foka) és a citotoxicitás jeleit. Minden egyes lyuk táptalaját két egyenlő mennyiségű részre osztjuk (egyenként körülbelül 490 µl), és átvisszük két megfelelően jelölt fiolába (azaz lyukanként egy alikvot tartalék mintaként szolgál). A sejtek kiszáradásának megakadályozása érdekében egy időben egy sorból vagy oszlopból távolítjuk el a táptalajt, és helyére a sejtéletképességi/toxicitási vizsgálathoz szükséges táptalajt töltjük be. Ha a sejtéletképességet/citotoxicitást nem kell azonnal mérni, 200 µl PBS-t (Ca^{2+} és Mg^{2+} ionokkal) adunk az egyes lyukakhoz. A táptalajokat – 80 °C-on fagyasztjuk le a hormonkoncentrációk elemzését célzó további feldolgozásig (lásd a 44–46. bekezdést). Bár a T és az E2 a – 80 °C-on tartott táptalajban általában legalább 3 hónapig stabil marad, minden laboratóriumnak dokumentálnia kell a hormonok stabilitását a tárolás során.

41. A táptalaj eltávolítása után azonnal meghatározzuk a sejtek életképességét és a citotoxicitást az egyes expozíciós lemezeken.

A sejtek életképességének meghatározása

42. Szabadon választott sejtéletképességi/citotoxicitási vizsgálatot lehet használni a vizsgált vegyi anyag sejtek életképességére gyakorolt potenciális hatásának meghatározására. A vizsgálatnak alkalmasnak kell lennie arra, hogy pontosan mérje az adott lyukban lévő életképes sejtek százalékos arányát, vagy igazolni kell, hogy a vizsgálat közvetlenül összehasonlítható (lineáris függvénye) a Live/Dead® Assay-vel (lásd a validálási jelentés III. függelékét (4)). Egy másik vizsgálatról, az MTT-vizsgálatról [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid] (18) kimutatták, hogy ugyanolyan jól működik. A sejtek életképességének a fenti módszerek alkalmazásával történő értékelése egy relatív mérés, amely nem szükségszerűen mutat lineáris kapcsolatot a lyukban lévő sejtek abszolút számával. Ezért az elemzőnek el kell végeznie minden lyuk szubjektív képi értékelését is, illetve digitális képeket kell készítenie és archiválnia kell azokat az SC-kről és a két legnagyobb nem citotoxikus koncentrációról a valós sejtsűrűség későbbi értékelése céljára, amennyiben erre lenne szükség. Ha a vizuális ellenőrzés során úgy tűnik, vagy ha az életképességi/citotoxicitási vizsgálat azt mutatja, hogy a sejtek száma megnövekedett, a látszólagos növekedést ellenőrizni kell. Ha a sejtszám növekedése megerősítésre kerül, ezt jelezni kell a vizsgálati jegyzőkönyvben. A sejtek életképességét az SC-k átlagos válaszához viszonyítva fejezzük ki, amelyet 100 %-ban életképes sejtekből állónak tekintünk, és kiszámítása az alkalmazott sejtéletképességi/citotoxicitási vizsgálatnak megfelelően történik. Az MTT-vizsgálat esetében a következő képletet lehet használni:

▼M5

életképes sejtek % = (válasz a lyukban – átlagos válasz a MeOH-kezelt lyukakban [= 100 % halott]) ÷ (átlagos válasz az SC-lyukakban – átlagos válasz a MeOH-kezelt lyukakban [= 100 % halott])

43. Az SC-k átlagos életképességéhez (= 100 %-os életképesség) viszonyított 80 %-nál alacsonyabb életképességet mutató lyukakat nem kell figyelembe venni az adatok végső elemzésénél. A szteroidogenezis csaknem 20 %-os citotoxicitás mellett történő gátlását gondosan mérlegelni kell annak biztosítása érdekében, hogy nem a citotoxicitás az oka a gátlásnak.

Hormonanalízis

44. Minden laboratórium az általa kiválasztott hormonmérési rendszert használhatja a T és az E2 analíziséhez. Az egyes kezelési csoportok táptalajának tartalék alikvotjait hígítások készítésére lehet használni, hogy a koncentrációt a standard görbe lineáris részébe hozzuk. Amint az a 29. bekezdésben kihangsúlyozásra került, a laboratóriumoknak a QC-futtatások vagy a vegyi anyagok vizsgálata előtt belső hormon kontrollal kezelt kiegészített táptalaj elemzésével bizonyítania kell, hogy a hormonmérési rendszere (pl. ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) megfelel a QC-kritériumoknak. Annak érdekében, hogy a vizsgálati rendszer összetevői ne zavarják a hormonok mérését, szükség lehet a hormonok kivonására a táptalajból a mérés előtt (az extrakció szükséges vagy nem szükséges voltának eldöntését megalapozó feltételeket lásd a 30. bekezdésben). Az extrakciót javasolt a validálási jelentés III. függelékben foglalt eljárásoknak megfelelően elvégezni (4).

45. Amennyiben kereskedelmi tesztkészletet használunk a hormontermelés mérésére, a hormonanalízist a vizsgálati készlet gyártójának kézikönyvében megadottak szerint kell végezni. A legtöbb gyártó egyedülálló eljárással rendelkezik a hormonanalízisek elvégzésére. A minták hígításait úgy kell módosítani, hogy az oldószer kontrollok várható hormonkoncentrációi az adott vizsgálat standard görbéje lineáris tartományának középpontjába essenek (a validálási jelentés III. függeléke (4)). A standard görbe lineáris részén kívüli értékeket el kell utasítani.

46. A végső hormonkoncentráció kiszámítása az alábbiak szerint történik:

Példa:

Kivont anyag:	450 µl táptalaj
Rekonstituálva:	250 µl vizsgálati pufferben
Hígítás a vizsgálatban:	1:10 (ahhoz, hogy a minta a standard görbe lineáris tartományába kerüljön)
Hormonkoncentráció a vizsgálatban:	150 pg/ml (már hozzáigazítva a vizsgált minta ml-enkénti koncentrációjához)
Kinyerési fok:	89 %
Végső hormonkoncentráció =	(hormonkoncentráció (ml-enként) ÷ kinyerési fok) × (hígítási faktor)
Végső hormonkoncentráció =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) ×10 = 936,3 pg/ml

▼M5

A tesztkoncentrációk megválasztása

47. A legalább két, egymástól független futtatást kell a vizsgálatból végezni. Ajánlott, hogy a kezdeti futtatáshoz a vizsgálati koncentrációkat $\log_{10}$ intervallumokra határozzuk meg egymástól és 10^{-3} M legyen a maximális koncentráció, kivéve, ha olyan előzetes, például az oldhatóság korlátaira vagy citotoxicitásra vonatkozó információ áll rendelkezésre, amely a vizsgálati koncentrációk megválasztásának alapjául szolgálhat. Ha a vegyi anyag oldható, egyik tesztelt koncentrációban sem citotoxikus, és az első futtatás negatív volt minden koncentrációban, akkor ezt egy vagy több, az első futtatással megegyező feltételeket alkalmazó futtatásban meg kell erősíteni (7. táblázat). Ha az első futtatás eredményei nem egyértelműek (azaz az SC-hez viszonyított valahányszoros változás csak egyetlen koncentrációban statisztikailag szignifikáns) vagy pozitívak (azaz a valahányszoros változás két vagy több szomszédos koncentrációban is statisztikailag szignifikáns), a vizsgálatot a 7. táblázatnak megfelelően a kiválasztott vizsgálati koncentráció finomításával meg kell ismételni. A második és harmadik futtatásban (ha van ilyen) alkalmazott tesztkoncentrációkat az első futtatás eredményei alapján ki kell igazítani, a hatást kiváltó koncentrációkat 1/2 log koncentráció intervallumokkal közrefogva (pl. ha 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 μM eredeti futtatása indukciót eredményezett az 1 és 10 μM koncentrációknál, a második futtatásban a vizsgált koncentrációknak 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM-nak kell lenniük), kivéve, ha alacsonyabb koncentrációkat kell alkalmazni a LOEC eléréséhez. Az utóbbi esetben a második futtatásban legalább öt, az első futtatásban vizsgált legalacsonyabb koncentráció alatti koncentrációt kell használni fél-logaritmikus skála segítségével. Ha a második futtatás nem erősíti meg az első futtatást (azaz statisztikai szignifikancia nem fordul elő a korábban pozitívan vizsgált koncentráció ± 1 koncentráció-növekmény értéknél), egy harmadik kísérletet kell végezni az eredeti vizsgálati körülmények mellett. Az első futtatás nem egyértelmű eredményeit negatívnak tekintjük, ha a két következő futtatás egyike sem erősítette meg a megfigyelt hatást. A nem egyértelmű eredményeket pozitív válasznak (hatás) tekintjük, ha a választ legalább még egy futtatással meg lehet erősíteni ± 1 koncentrációnövekményen belül (az adatok értelmezési eljárását lásd az 55. bekezdésben).

7. táblázat

A lehetséges kimenetelek döntési mátrixa

1. futtatás	2. futtatás		3. futtatás		Döntés	
Kimenetel	Döntés	Kimenetel	Döntés	Kimenetel	Pozitív	Negatív
Negatív	Megerősítés ([a])	Negatív	Stop			X
Negatív	Megerősítés ([a])	Pozitív	Finomítás ([b])	Negatív		X
Kétes ([c])	Finomítás ([b])	Negatív	Megerősítés ([a])	Negatív		X
Kétes ([c])	Finomítás ([b])	Negatív	Megerősítés ([a])	Pozitív	X	
Kétes ([c])	Finomítás ([b])	Pozitív			X	
Pozitív	Finomítás ([b])	Negatív	Megerősítés ([a])	Pozitív	X	

▼M5

1. futtatás	2. futtatás		3. futtatás		Döntés	
Kimenetel	Döntés	Kimenetel	Döntés	Kimenetel	Pozitív	Negatív
Negatív	Megerősítés ([a])	Pozitív	Finomítás ([b])	Pozitív	X	
Pozitív	Finomítás ([b])	Pozitív	Stop		X	

([a]) A korábbi futtatást ugyanazon kísérleti terv használatával meg kell erősíteni.
([b]) A vizsgálatot 1/2-log koncentrációintervallumokkal újra kell futtatni (közrefogva azt a koncentrációt, amelyik jelentősen különböző vizsgálati eredményt adott az előző kísérletben).
([c]) Az SC-hez viszonyított valahányszoros változás egy adott koncentrációnál statisztikailag szignifikánsan eltér.

A tesztlemez minőség-ellenőrzése

48. A QC-lemezre vonatkozó kritériumokon túlmenően a párhuzamos lyukak közötti eltérésekre, az ismételt kísérletekre, a hormonmérési rendszerek linearitására és érzékenységére, az ugyanazon minta párhuzamos hormonmérései közötti variabilitásra, és a hormoncsúcsoknak a táptalaj extrakciója (ha van ilyen; az extrakciós követelmények tekintetében lásd a 30. bekezdést) utáni százalékos visszanyerésére vonatkozó egyéb minőségi kritériumokat is teljesíteni kell, amelyeket a 8. táblázat tartalmaz. Az adatoknak az egyes paraméterekre meghatározott elfogadható tartományon belül kell esnie, hogy figyelembe vehessük azokat a további értékelés során. Amennyiben ezek a feltételek nem teljesülnek, a táblázatban meg kell jegyezni, hogy a szóban forgó minta esetében a QC-kritériumok nem teljesültek, és a mintát újra kell elemezni vagy ki kell zárni az adathalmazból.

8. táblázat

A H295R-vizsgálati tesztlemez paramétereinek elfogadható tartományai és/vagy variációja (%).

LOQ: a hormonmérési rendszer meghatározási határa; SC: oldószerkontroll; DPM: percenkénti bomlás

	Összehasonlítandó	T	E2
Bazális hormontermelés az SC-kben	Az LOQ valahányszorosa	≥ 5-ször	≥ 2,5-szer
Expozíciós követelmények – Lemezen belüli relatív szórás az SC-k esetében (párhuzamos lyukak)	Abszolút koncentrációk	≤ 30 %	≤ 30 %
Expozíciós követelmények – Lemezek közötti relatív szórás az SC-k esetében (megismételt kísérletek)	Valahányszoros változás	≤ 30 %	≤ 30 %
Hormonmérési rendszer – Érzékenység	Kimutatható valahányszoros növekedés az OK-hoz viszonyítva	≥ 5-ször	≥ 2,5-szer
Hormonmérési rendszer – Ismételt mérés relatív szórása az SC-k esetében ([a])	Abszolút koncentrációk	≤ 25 %	≤ 25 %
Táptalaj extrakciója – A belső 3H standard kinyerése (ha van ilyen)	DPM	≥ 65 % nominális	

([a]) Ugyanazon minta ismételt méréseire vonatkozik.

▼M5

ADATELEMZÉS ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatelemzés

49. A vegyi anyag által módosított hormontermelés relatív növekedésének/csökkenésének értékeléséhez az eredményeket normalizálni kell az egyes tesztlemezek átlagos SC-értékéhez, és az eredményeket az SC-khez viszonyított változtatásban kell kifejezni minden tesztlemezen. Minden adatot átlag ± 1 szórás formában kell kifejezni.

50. Az adatok elemzése során csak az olyan lyukakból származó hormonadatokat kell figyelembe venni, ahol a citotoxicitás alacsonyabb volt 20 %-nál. A relatív változásokat a következő módon kell kiszámítani:

Relatív változás = (hormonkoncentráció a lyukban) ÷ (oldószeres kontroll lyukak átlagos hormonkoncentrációja).

51. Ha a lyuk vizuális ellenőrzése során úgy tűnik, vagy ha a 42. bekezdésben leírt életképességi/citotoxicitási vizsgálat azt mutatja, hogy a sejtek száma megnövekedett, a látszólagos növekedést ellenőrizni kell. Ha a sejtszám növekedése megerősítésre kerül, ezt jelezni kell a vizsgálati jegyzőkönyvben.

52. Statisztikai elemzések végzése előtt a normalitásra és a szóráshomogenitásra vonatkozó feltételezéseket ki kell értékelni. A normalitást standard probability plotok használatával vagy más megfelelő statisztikai módszerrel (pl. Shapiro-Wilk-teszt) kell értékelni. Ha az adatok (valahányszoros változások) nem normális eloszlásúak, akkor meg kell próbálni átalakítani az adatokat, hogy megközelítsék a normális eloszlást. Ha az adatok normális vagy megközelítőleg normális eloszlásúak, a vegyi anyag koncentrációcsoportjai és az SC-k közötti különbségeket egy paraméteres teszttel (pl. Dunnett-teszt) kell elemezni, ahol a *koncentráció* a független és a *válasz* (valahányszoros változás) a függő változó. Ha az adatok nem normális eloszlásúak, egy megfelelő nem-paraméteres tesztet kell alkalmazni (pl. Kruskal Wallis, Steel's Many-one rank teszt). A különbségeket $p \leq 0,05$ esetén tekintjük szignifikánsnak. Az egyes lyukak statisztikai értékelését az átlagos értékek alapján végezzük el, amelyek független párhuzamos adatpontokat testesítenek meg. Mivel nagy a dózisok közötti távolság az első futtatásban ($\log_{10}$-skála), várható, hogy sok esetben nem lehetséges egyértelmű koncentráció-válasz kapcsolatokat leírása, ha a két legnagyobb dózis a szigmoid görbe lineáris részén van. Ezért az első futtatás vagy bármely más adathalmaz esetében, ahol ez a feltétel bekövetkezik (például ahol a maximális hatékonyság nem becsülhető), I. típusú rögzített változós statisztikákat kell alkalmazni a fent leírtak szerint.

53. Ha több mint két adatpont fekszik a görbe lineáris részén és ha a maximális hatékonyságot ki lehet számítani – amint az egyes 2. futtatások esetében várható, amelyek az expozíciós koncentrációk fél-log távolságát használják – probit, logit vagy egyéb megfelelő regressziós modellt kell használni a hatékony koncentrációk (pl. EC50 és EC20) kiszámításához.

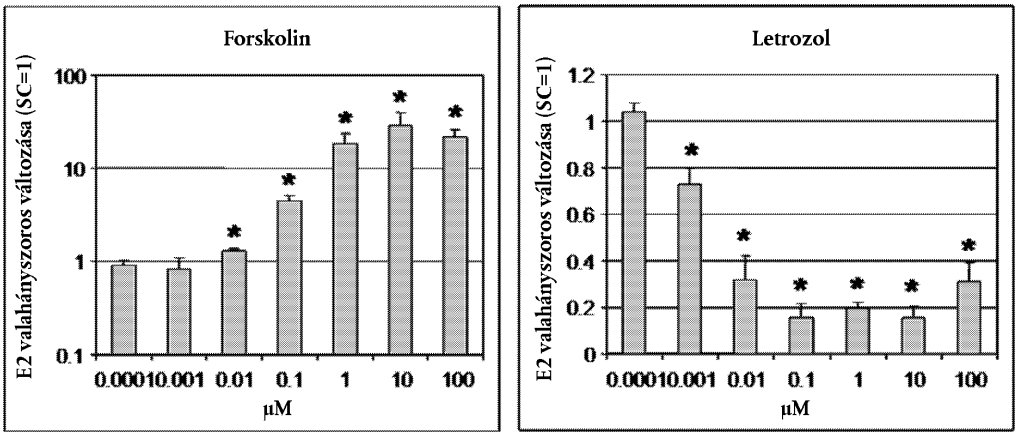
54. Az eredményeket mind grafikus (átlag ± 1 szórást képviselő oszlopdiagramok), mind táblázatos (LOEC/NOEC, hatásirány, és a maximális válasz ereje, amely a dózis-válasz adatok részét képezi) formátum biztosítani kell (lásd a példát a 3. ábrán). Az adatok értékelése csak akkor tekinthető érvényesnek, ha az legalább két, egymástól függetlenül végzett futtatáson alapul. Egy kísérlet vagy futtatás akkor tekinthető függetlennek, ha azt másik időpontban, új oldatokkal és kontrollokkal végeztük el. A 2. és 3. futtatásban (ha szükséges) alkalmazott koncentrációtartományt ki lehet igazítani az 1. futtatás eredményei alapján, hogy jobban meghatározza a LOEC-t tartalmazó dózis-válasz tartományt (lásd a 47. bekezdést).

▼M5

3. ábra

Példa a H295R-vizsgálat során nyert adatok bemutatására és értékelésére grafikus és táblázatos formában.

A csillagok az oldószeres kontrollhoz viszonyított statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik *(p< 0,05)*.
LOEC: megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció; Maximális változás: a bármilyen koncentráció mellett megfigyelt válasz legnagyobb erőssége az SC-válasz átlagához (= 1) képest.



Vegyi anyag	LOEC	Maximális változás
Forskolin	0,01	0,15-szörös
Letrozol	0,001	29-szeres

Az adatok értelmezési eljárása

55. A vizsgált vegyi anyagot akkor ítéljük pozitívnak, ha a valahányszoros indukció két szomszédos koncentrációban legalább két független futtatás során statisztikailag eltér ($p \leq 0,05$) a kontroll oldószertől (7. táblázat). A vizsgált vegyi anyagot akkor ítéljük negatívnak, ha két független futtatás negatív eredményt ad, vagy három futtatás esetén, ha két futtatás negatív, és egy kétes vagy pozitív. Ha a három független kísérlet során generált adatok nem felelnek meg a 7. táblázatban felsorolt döntési kritériumoknak, a kísérleti eredmények nem értelmezhetők. Az oldhatóság határait meghaladó vagy citotoxikus koncentrációnál elért eredményeket nem kell figyelembe venni az eredmények értelmezésénél.

Vizsgálati jegyzőkönyv

56. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgáló intézmény

— létesítmény neve és helye,

— vizsgálatvezető és egyéb személyzet, valamint a vizsgálattal kapcsolatos felelősségi körök,

— a vizsgálat kezdetének és végének dátuma.

▼**M5**

Vizsgált vegyi anyag, reagensek és kontrollok

— azonosító (adott esetben név/CAS-szám), forrás, tételszám, tisztaság, szállító, valamint a vizsgált vegyi anyag, a reagensek és a kontrollok jellemzői,

— a vizsgált vegyi anyag fizikai természete és főbb fizikai-kémiai tulajdonságai,

— a vizsgált vegyi anyagok, reagensek és kontrollok tárolási körülményei, az előkészítés módja és gyakorisága,

— a vizsgált vegyi anyag stabilitása.

Sejtek

— a sejtek forrása és típusa,

— a tesztben használt sejtek passzálásainak száma (passzázsazonosító),

— a sejtkultúrák fenntartása használt eljárás leírása.

Vizsgálat előtti követelmények (ha van ilyen)

— a vegyi anyag hormonvizsgálati interferencia tesztjének leírása és eredményeinek ismertetése,

— a hormonextrakciós hatásfok méréseinek leírása és eredményeinek ismertetése,

— valamennyi elvégzendő analitikai vizsgálat standard és kalibrációs görbéi,

— a választott analitikai vizsgálatok kimutatási határértékei.

Vizsgálati körülmények

— a táptalaj összetétele,

— a vizsgált vegyi anyag koncentrációja,

— sejtsűrűség (becsült vagy mért sejtkoncentráció 24 és 48 óra után),

— a vizsgált vegyi anyag oldhatósága (oldhatósági határérték, ha meghatároztuk),

— inkubációs idő és körülmények.

Vizsgálati eredmények

— a kontrollok és vizsgált vegyi anyagok lyukainak–a párhuzamos méréseknek a nyers adatai, a hormontermelés mérésére használt műszer eredeti adatformátumában (pl. OD, fluoreszcencia egységek, DPM stb.),

— a normalitás validálása vagy az adatok transzformációjának magyarázata,

— a lyukanként mért átlagos válaszok ± 1 szórás,

— citotoxicitási adatok (citotoxicitás okozó vizsgálati koncentrációk),

— annak megerősítése, hogy QC-követelmények teljesültek,

▼M5

— sejttoxicitással korrigált relatív változás az oldószeres kontrollhoz viszonyítva,

— az egyes koncentrációknál észlelt relatív változást (valahányszoros változás) mutató oszlopdiagram, a szórás és a statisztikai szignifikancia a 49–54. bekezdés szerint.

Az adatok értelmezése

— alkalmazzuk az adatértelmezési eljárást az eredményekre, és vitassuk meg az eredményeket.

Diszkusszió

— Van-e utalás a vizsgálatban arra az eshetőségre, hogy a T/E2-adatokat befolyásolták a glüko- és mineralokortikoid utakra kifejtett közvetett hatások?

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, in Appendix 2 to Chapter B.54 of this Annex

(2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 217, 114-124.

(3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res*., 14, 23 – 30.

(4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Available at [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

(5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis,* OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Available at: [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, Available at: [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

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Konfluencia: az a lefedettség vagy proliferáció, amelyet a sejtek a táptalaj felületén vagy a táptalajban elérnek.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Relatív szórás: a statisztikai eloszlás szórásának és számtani középértékének hányadosa.

CYP: a citokróm P450 monooxigenázok, egy géncsalád és a belőlük előállított enzimek, amelyek a legkülönbözőbb biokémiai reakciók katalizálásában vesznek részt, köztük a szteroidhormonok szintézisében és anyagcseréjében is.

DPM: percenkénti bomlásszám. Azon atomok száma adott mennyiségű radioaktív anyagban, amelyek az észlelés szerint egy perc alatt lebomlanak.

E2: a 17β-ösztradiol, a legfontosabb ösztrogén az emlősök szervezetében.

H295R sejtek: humán adrenocarcinoma-sejtek, amelyek a zónásan differenciálatlan humán magzati mellékvesesejtek fiziológiai jellemzőivel rendelkeznek, és amelyek a szteroidogenezis-útvonal összes enzimét kifejezik. Az ATCC-től szerezhetők be.

Fagyasztó táptalaj: a sejtek lefagyasztására és a fagyasztott sejtek tárolására használt táptalaj. Alapmédiumból, valamint BD NuSerum-ból és dimetil-szulfoxidból áll.

Lineáris tartomány: az a tartomány egy hormonmérési rendszer standard görbéjén, amelyen belül az eredmények a mintában jelen lévő analit koncentrációjával arányosak.

LOQ: a meghatározási határ, vagyis az a legkisebb vegyianyag-mennyiség, amely egy megadott konfidenciahatáron belül megkülönböztethető az adott vegyi anyag hiányától (üres érték). Ha a szöveg másként nem jelzi, e módszer alkalmazásában az LOQ-t jellemzően a vizsgálati rendszer gyártója határozza meg.

LOEC: a megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció, vagyis az a legkisebb koncentráció, amelynél a vizsgálat által adott válasz statisztikailag eltér az oldószerkontrollétól.

NOEC: a megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció, vagyis az a legnagyobb vizsgált koncentráció, amelynél a vizsgálat még nem ad pozitív választ.

Passzázs: az a szám, ahányszor a sejteket felosztottuk a sejtkultúrának a fagyasztott állományból való elindítása után. A fagyasztott állományból indított első passzázshoz az egyes szám van hozzárendelve (1). Az egy alkalommal már felosztott sejtek alkotják a 2. passzázst, stb.

PBS: a Dulbecco-féle, foszfáttal pufferolt sóoldat.

Minőség-ellenőrzés: rövidítve QC, az érvényes adatok biztosításához szükséges intézkedések összessége.

Minőség-ellenőrzési lemez: olyan 24 lyukú lemez, amely két-két koncentrációt tartalmaz pozitív és negatív kontrollból, és az új sejttételek viselkedésének ellenőrzésére, illetve a vegyi anyagok vizsgálatához szükséges pozitív kontroll biztosítására szolgál.

Futtatás: új oldatokkal és kontrollokkal elvégzett független vizsgálat.

▼**M5**

Alapközeg: az egyéb reagensek elkészítésének alapja. A Dulbecco-féle módosított Eagle-táptalaj és a Ham-féle F-12 tápanyagkeverék 1:1 arányú keveréke (DMEM/F12) 15 mM HEPES-pufferben, fenolvörös és nátrium-hidrogén-karbonát nélkül. Pufferként nátrium-hidrogén-karbonáttal egészítik ki, lásd a validálási jelentés II. függelékét (4).

Kiegészített táptalaj: alapközegből plusz BD Nu-Serum-ból és ITS+ premium mixből álló táptalaj, lásd a validálási jelentés II. függelékét (4).

Szteroidogenezis: a koleszterintől a különböző szteroidhormonok szintéziséhez vezető út. A szteroidszintézis számos intermediere, mint például a progeszteron és a tesztoszteron önmagukban is fontos hormonok, de egyúttal prekurzorai is a szintézis folyamatában később keletkező hormonoknak.

T: tesztoszteron, a két legfontosabb androgén egyike az emlősök szervezetében.

Vizsgált vegyi anyag: e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Vizsgálati lemez: az a lemez, amelyen a H295R-sejteket kitesszük a vizsgált anyag hatásának. A vizsgálati lemezek három-három példányt tartalmaznak az oldószeres kontrollból, valamint a vizsgált vegyi anyag hét koncentrációszintjéből.

Tripszin 1X: a tripszin, egy, a hasnyálmirigyben termelődő szerin-proteáz enzim híg oldata, amelyet arra használunk, hogy leválasszuk a sejteket a sejttenyésztő lemezről, lásd a validálási jelentés III. függelékét (4).

▼M5

B.58. TRANSZGENIKUS RÁGCSÁLÓ SZOMATIKUS ÉS CSÍRASEJT GÉNMUTÁCIÓS VIZSGÁLATOK

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 488. vizsgálati iránymutatásában (2013) leírt módszerrel. Az *in vitro* mutációs vizsgálatok széles köréhez állnak rendelkezésre európai uniós vizsgálati módszerek, amelyek ki tudják mutatni a kromoszóma- és/vagy génmutációkat. Léteznek vizsgálati módszerek az *in vivo* végpontokhoz is (pl. kromoszóma-rendellenességek és nem tervezett DNS-szintézis), ezek azonban nem mérik a génmutációt. A transzgenikus rágcsáló (TGR) mutációs tesztek kielégítik a gyakorlatias és széles körben elérhető *in vivo* génmutációs tesztek iránti igényt.

2. A TGR mutációs teszteket alaposan felülvizsgálták (24) (33). Ezek a tesztek transzgenikus patkányokat és egereket használnak, amelyek a kromoszómába integrált plazmid vagy a fág shuttle vektorok több példányát is tartalmazzák. A transzgének riporter géneket tartalmaznak a vizsgált vegyi anyagok által *in vivo* indukált különböző típusú mutációk kimutatása céljából.

3. A rágcsálóban előforduló mutációkat úgy értékeljük, hogy a transzgént kinyerjük és a riporter gén fenotípusát egy olyan bakteriális gazdasejtben elemezzük, amelyből hiányzik ez a riporter gén. A TGR génmutációs vizsgálatok a rágcsálók szinte bármely szövetéből visszanyert, genetikailag semleges génekben előidézett mutációkat mérni tudják. Ezek a vizsgálatok tehát megkerülik a legtöbb meglévő korlátot, amelyek az endogén gének *in vivo* génmutációs vizsgálataihoz kapcsolódnak (pl. a szövetek korlátozott alkalmassága az elemzésre, negatív/pozitív szelekció a mutációkkal szemben).

4. A bizonyítékok azt jelzik, hogy a transzgének hasonló módon reagálnak mutagénekre, mint az endogén gének, különösen a bázispár szubsztitúciók, a frameshift mutációk, és a kis deléciók és inszerciók kimutatása tekintetében (24).

5. A genotoxicitás vizsgálatával foglalkozó nemzetközi műhely (International Workshops on Genotoxicity Testing – IWGT) jóváhagyta a TGR génmutációs vizsgálatok felvételét a génmutációk *in vivo* kimutatására szolgáló vizsgálatok közé, és egy protokollt javasolt a végrehajtásukra (15) (29). Ez a vizsgálati módszer ezen az ajánláson alapul. A protokoll használatát támogató további elemzések találhatók a szakirodalomban (16).

6. Várható, hogy a TGR génmutációs vizsgálatot a jövőben össze lehet majd kapcsolni egy ismételt dózisú toxicitási vizsgálattal (e melléklet B.7. fejezete). Adatokra van azonban szükség annak igazolására, hogy a TGR génmutációs tesztek érzékenységét nem befolyásolja az ismételt dózisú toxikológiai vizsgálatban használt, az adagolási időszak vége és a mintavételi idő közötti rövidebb, egynapos időtartam, szemben a TGR génmutációs tesztekben használt 3 nappal. Az adatokra annak igazolása céljából is szükség van, hogy az ismételt dózisú vizsgálat teljesítményét nem érinti hátrányosan a transzgenikus rágcsálótörzs használata a hagyományos rágcsálótörzsek helyett. Amikor ezek az adatok rendelkezésre állnak, a módszert aktualizálni fogják.

7. A kulcsfontosságú fogalmak meghatározásai a függelékben találhatók.

▼M5

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

8. Azok a TGR génmutációs vizsgálatok, amelyek esetében elegendő adat áll rendelkezésre, hogy támogassák az alkalmazását ebben a vizsgálati módszerben, a következők: *lacZ*-bakteriofág egér (Muta™Mouse); *lacZ*-plazmid egér; *gpt*-delta (gpt és Spi$^-$) egér és patkány; *lacI*-egér és -patkány (Big Blue®), standard körülmények között elvégezve. Ezen túlmenően a *cII* pozitív szelekciós vizsgálat használható a mutációk értékelésére a Big Blue® és Muta™Mouse modellekben. A mutagenezist a TGR modellekben általában mutációs gyakoriságként értékelik; szükség esetén azonban további információkat nyújthat a mutációk molekuláris elemzése (lásd a 24. bekezdést).

9. A rágcsáló *in vivo* génmutációs vizsgálatok különösen fontos szerepet játszanak a mutagén veszély becslésében, mivel az ezekben a vizsgálatokban adott válaszok az *in vivo* metabolizmustól, a farmakokinetikától, a DNS-javító folyamatoktól és a transzlációs DNS-szintézistől függenek, bár ezek a különböző fajok, a különböző szövetek és a különböző típusú DNS-károsodások esetén eltérőek lehetnek. A génmutációk *in vivo* vizsgálata hasznos eszköz az *in vitro* rendszerben észlelt mutagén hatások további vizsgálata, valamint a más *in vivo* végpontokat használó vizsgálatok eredményeinek nyomonkövetése során (24). A génmutáció amellett, hogy ok-okozati összefüggésben áll a rákos megbetegedés indukciójával, fontos végpont a szomatikus szövetek mutációalapú, nem daganatos betegségeinek (12) (13), valamint a csíravonalon keresztül átadott betegségek előrejelzése szempontjából is.

10. Ha bizonyíték van arra, hogy a vizsgált vegyi anyag vagy egy fontos metabolitja nem éri el egyik célszövetet sem, akkor a TGR génmutációs vizsgálat nem alkalmazható.

A VIZSGÁLAT ELVE

11. A 8. bekezdésben leírt vizsgálatokban a megcélzott gén bakteriális vagy bakteriofág-eredetű, ezért a rágcsáló genomiális DNS-éből való visszanyerés eszköze a transzgén beépítése egy λ-bakteriofágba vagy egy plazmid shuttle vektorba. Az eljárás magában foglalja a genomiális DNS-nek a rágcsáló célszövetéből való extrakcióját, a genomiális DNS in vitro feldolgozását (azaz a λ-vektorok becsomagolását, vagy a plazmidok ligációját és elektroporációját a shuttle vektor helyreállítására), valamint a mutációk azt követő kimutatását a bakteriális gazdaszervezetben, megfelelő körülmények között. A vizsgálatokhoz semleges transzgéneket használunk, amelyek a legtöbb szövetből könnyen kinyerhetők.

12. Az alap TGR génmutációs kísérlet során a rágcsálót meghatározott ideig kezeljük a vegyi anyaggal. A vegyi anyagot bármilyen megfelelő útvonalon beadhatjuk, beleértve a beültetést is (pl. orvosi eszközök vizsgálata). Azt a teljes időtartamot, ameddig az állatnak a vegyi anyagot adagoljuk, adagolási időszaknak nevezik. Az adagolást általában egy olyan időszak követi az állat elpusztítása előtt, amelynek során a vegyi anyagot nem adagoljuk és amelynek során a kijavítatlan DNS-léziók stabil mutációként rögzülnek. A szakirodalomban ezt az időszakot többféleképpen is nevezik: manifesztációs idő, fixációs idő vagy expressziós idő; az időszak vége a mintavétel időpontja (15) (29). Az állat elpusztítását követően genomiális DNS-t izolálunk a célszövet(ek)ből és megtisztítjuk.

▼M5

13. Adott állat egyféle szövetének több csomagolásból/ligálásból származó adatait általában aggregáljuk, és a mutációs gyakoriságot általában összesen 10^5-10^7 plakk-képző vagy kolóniaképző egység használatával értékeljük. Pozitív szelekciós módszer alkalmazása esetén az összes plakk-képző egységet meghatározzuk egy külön nem szelektív lemezkészlettel.

14. A pozitív szelekciós módszereket azért fejlesztették ki, hogy megkönnyítsék a mutációk kimutatását mind a *gpt*-génben [*gpt*-delta egér és patkány, *gpt*⁻ fenotípus (20) (22) (28)], mind a *lacZ*-génben [Muta™Mouse vagy *lacZ*-plazmid egér (3) (10) (11) (30)]; eközben a *lacI*-gén mutációit Big Blue® állatokban egy nem szelektív módszerrel mutatják ki, amely színes (kék) plakkok képződésén keresztül azonosítja a mutációkat. Pozitív szelekciós módszer is rendelkezésre áll a λ-bakteriofág shuttle vektor *cII*-génjében fellépő pontmutációk [Big Blue® egér vagy patkány és Muta™Mouse (17)] és a λ-*red* és -*gam* génekben fellépő deléciós mutációk észlelésére [Spi⁻ szelekció *gpt*-delta egérben és patkányban (21) (22) (28)]. A mutációs gyakoriságot úgy számítjuk ki, hogy a transzgénben mutációkat tartalmazó plakkok/plazmidok számát elosztjuk az azonos DNS-mintából kinyert összes plakk/plazmid számával. A TGR génmutációs vizsgálatokban a mutációs gyakoriság a jegyzőkönyvezett paraméter. Ezen túlmenően, a mutációs gyakoriságot a független mutációkat hordozó sejtek hányadaként is meg lehet határozni; ehhez a számításhoz szükség van a klonális expanzióval való korrekcióra, amelyet a kinyert mutációk szekvenálásával végeznek el (24).

15. A *lacI*, *lacZ*, *cII* és a *gpt* pontmutációs tesztekben kimutatott mutációk főként bázispár szubsztitúciós mutációk, frameshift mutációk és kis inszerciók/deléciók. Az ilyen típusú mutációk relatív aránya a spontán mutációk között hasonló ahhoz, mint amit az endogén *Hprt*-génben megfigyeltek. A nagy deléciókat csak a Spi⁻ szelekcióval és a *lacZ* plazmid vizsgálatokkal lehet kimutatni (24). Az érdeklődésre számot tartó mutációk az egérben vagy patkányban *in vivo* előforduló mutációk. Az *in vitro* és *ex vivo* mutációk, amelyek a fág/plazmid kinyerés, replikáció vagy javítás során fordulhatnak elő, viszonylag ritkák, és egyes rendszerekben konkrétan beazonosíthatók vagy a bakteriális gazda/pozitív szelekciós rendszerrel kizárhatók.

A MÓDSZER ISMERTETÉSE

Előkészületek

Az állatfaj kiválasztása

16. Jelenleg már többféle transzgenikus egéren végzett génmutáció-detektálási modell is létezik, és ezeket a rendszereket szélesebb körben használják, mint a transzgenikus patkányos modelleket. Ha a patkány egyértelműen alkalmasabb modell, mint az egér (például amikor olyan daganat karcinogenezisének mechanizmusát vizsgáljuk, amely csak patkányokban fordul elő, amikor patkányon végzett toxicitási vizsgálattal való összehasonlításra van szükség, vagy ha a patkány anyagcseréjéről ismert, hogy jobban reprezentálja az emberi anyagcserét), meg kell fontolni a transzgenikus patkányos modellek használatát.

Tartási és etetési körülmények

17. A kísérleti állatokat ideálisan 22 °C (± 3 °C) hőmérsékletű helyiségben kell tartani. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg nem haladhatja meg a 70 %-ot, célértékként az 50–60 % relatív páratartalom fenntartására kell törekedni. A világítás legyen mesterséges, naponta 12 órás világos időszakkal, amelyet 12 órás sötét periódusok kövessenek. Az etetéshez hagyományos laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz

▼M5

biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgált vegyi anyaggal való megfelelő keveredés igénye is befolyásolhatja, ha a vizsgált vegyi anyagot ezen az úton adjuk be. Az állatokat azonos nemű állatokból álló kis csoportokban (legfeljebb öt állat) kell elhelyezni, amennyiben nem várható agresszív viselkedés. Ha tudományos szempontból indokolt, az állatok egyedileg is elhelyezhetők.

Az állatok előkészítése

18. Az egészséges, fiatal, ivarérett felnőtt (a kezelés kezdetén 8–12 hetes) állatokat véletlenszerűen soroljuk be a kontroll- és a kezelési csoportokba. Az állatokat egyenként azonosítani kell. Az állatokat legalább öt napig szoktatni kell a laboratóriumi körülményekhez. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy a lehető legkisebb legyen a ketrec elhelyezésének lehetséges hatása. A vizsgálat kezdetén az állatok testtömege lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól, és a nemenkénti átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözhet.

A dózisok előkészítése

19. Az állatoknak történő adagolás előtt a szilárd halmazállapotú vizsgált vegyi anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni kell megfelelő oldószerekben vagy vivőanyagokban, vagy bele kell keverni a takarmányba vagy az ivóvízbe. A folyékony vizsgált vegyi anyagok közvetlenül vagy az adagolás előtt hígított formában alkalmazhatók. Belélegzéses expozíció esetén a vizsgált vegyi anyagok fizikai-kémiai tulajdonságaiktól függően gáz, gőz vagy szilárd/folyadék aeroszol formában adagolhatók. A vizsgált vegyi anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve akkor, ha az anyag tárolás során való stabilitása bizonyított.

Vizsgálati körülmények

Oldószer/Vivőanyag

20. Az oldószer/vivőanyag nem okozhat toxikus hatásokat a választott dózisok mellett, és nem alkalmazható olyan anyag, amelyről feltehető, hogy kémiai reakcióba fog lépni a vizsgált vegyi anyaggal. Ha nem jól ismert oldószert/vivőanyagot alkalmazunk, akkor felhasználását alá kell támasztani a kompatibilitását bizonyító referenciaadatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát ajánlatos megfontolni.

Pozitív kontrollok

21. Általában szükséges párhuzamos pozitív kontrollállatokat használni. Azokban a laboratóriumokban azonban, amelyek igazolták a szakértelmüket (lásd a 23. bekezdést) és rendszeresen végzik ezeket a vizsgálatokat, a módszer sikerességének igazolására a korábban pozitív kontrollal kezelt állatokból származó DNS is felhasználható. Az ilyen korábbi kísérletekből származó DNS-eket ugyanabból a fajból és célszövetből kell venni, és megfelelően kell tárolni (lásd a 36. bekezdést). Párhuzamos pozitív kontrollok használatakor nem szükséges az állatokat ugyanazon az útvonalon kezelni, mint a vizsgált vegyi anyag esetében, azonban a pozitív kontrolloknak bizonyítottan mutációkat kell kiváltaniuk a vizsgált vegyi anyag egy vagy több célszövetében. A pozitív kontroll céljára felhasznált vegyi anyagok dózisait úgy kell megválasztani, hogy olyan, gyenge vagy mérsékelt hatást váltsanak ki, amely kritikus a vizsgálati eljárás működése és érzékenysége szempontjából. A pozitív kontroll céljára felhasználható vegyi anyagokra és a hozzájuk tartozó célszövetekre az 1. táblázat tartalmaz példákat.

▼M5

1. táblázat

Példák a pozitív kontroll céljára felhasználható vegyi anyagokra és azok célszöveteire

Pozitív kontroll vegyi anyag és CAS-száma	EINECS-név és EINECS-szám	Jellemzők	Mutációs célszövet	
			Patkány	Egér
N-etil-N-nitrózurea [CAS-szám: 759-73-9]	N-etil-N-nitrózurea [212-072-2]	Közvetlenül ható mutagén	Máj, tüdő	Csontvelő, vastagbél, vastagbél-epithelium, belek, máj, tüdő, lép, vese, petefészek granulosa sejtek, hím csírasejtek
Etil-karbamát (uretán) [CAS-szám: 51-79-6]	Uretán [200-123-1]	Mutagén, metabolizmust igényel, de csak gyenge hatása van		Csontvelő, előgyomor, vékonybél, máj, tüdő, lép
2,4-diamino-toluén [CAS-szám: 95-80-7]	4-metil-m-fenilén-diamin [202-453-1]	Mutagén, metabolizmust igényel, pozitív az Spi⁻ vizsgálatban is	Máj	Máj
Benzo[a]pirén [CAS-szám: 50-32-8]	Benzo[def]krizén [200-028-5]	Mutagén, metabolizmust igényel	Máj, omenta	Csontvelő, emlő, vastagbél, előgyomor, mirigyes gyomor, szív, máj, tüdő, hím csírasejtek

Negatív kontrollok

22. Minden mintavételi időpontban negatív kontrollokat is kell használni, amelyeket csak oldószerrel és vivőanyaggal kezeltünk, és a kezelésük egyébiránt ugyanolyan módon történik, mint a kezelési csoportoké. Ha nem állnak rendelkezésre olyan történeti vagy publikált kontrolladatok, amelyek igazolják, hogy a választott oldószer/vivőanyag nem idéz elő ártalmas vagy mutagén hatásokat, a vivőanyag kontroll elfogadhatóságának megállapítása érdekében kezeletlen kontrollokat is alkalmazni kell minden mintavételi időpontban.

A laboratórium jártasságának igazolása

23. A szakértelmet ezekben a vizsgálatokban a publikált adatok alapján várható eredmények reprodukálására való képesség demonstrálásával kell megállapítani (24) a következő területeken: 1) mutációs gyakoriság pozitív kontroll vegyi anyagokkal (beleértve a gyenge válaszokat is), például az 1. táblázatban felsorolt anyagokkal, nem mutagénekkel, valamint vivőanyag kontrollokkal, és 2) transzgén kinyerése genomiális DNS-ből (pl. csomagolás hatékonysága).

A mutációk szekvenálása

24. Jogszabályi célú alkalmazás esetében a mutációk DNS-szekvenálása nem szükséges, különösen, ha a kapott eredmény egyértelműen pozitív vagy negatív. A szekvenálási adatok azonban hasznosak lehetnek, ha nagy interindividuális variáció figyelhető meg. Ezekben az esetekben a szekvenálást arra lehet használni, hogy kizárja a jackpot vagy klonális eseményeket az egyedi mutációk arányának egy adott szövetben való azonosításával. Állatonként és szövetenként körülbelül 10 mutáció szekvenálásának elegendőnek kell lennie annak egyszerű megállapításához, hogy a klonális mutációk hozzájárultak-e a mutációs gyakorisághoz; akár 25 mutáció szekvenálására

▼M5

lehet viszont szükséges a mutációs gyakoriság klonalitással való matematikai korrekciójához. A mutációk szekvenálása akkor is megfontolandó, amikor a mutációs gyakoriság kismértékű növekedését (azaz éppen csak meghaladja a kezeletlen kontroll értékeket) figyelik meg. A mutációs spektrumnak a kezelt és a kezeletlen állatokból származó mutáns telepek közötti különbségei alátámasztják a mutagén hatást (29). A mutációs spektrumok hasznosak lehetnek a mechanisztikus hipotézisek kifejlesztése során is. Ha a szekvenálást bele kell foglalni a vizsgálati protokollba, nagy figyelmet kell fordítani az ilyen vizsgálatok elrendezésére, különös tekintettel a mintánként szekvenált mutációk számára, hogy elérjük az alkalmazott statisztikai modell szerinti megfelelő erőt (lásd a 43. bekezdést).

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

25. Az állatok csoportonkénti számát úgy kell előre meghatározni, hogy elegendően nagy legyen ahhoz, hogy biztosítsa legalább a megduplázódott mutációs gyakoriság kimutatásához szükséges statisztikai erőt. A csoportméret legalább öt állat, de ha a statisztikai erő nem elegendő, az állatok számát szükség szerint növelni kell. Alapesetben hím állatokat kell használni. Előfordulhatnak olyan esetek, amikor indokolt lenne csak nőstényeket tesztelni, például ha nőkben alkalmazandó humán gyógyszereket tesztelnek, vagy amikor a nőkre jellemző metabolizmust vizsgálják. Ha jelentős különbségek vannak a nemek között toxicitás vagy anyagcsere szempontjából, akkor hímekre és nőstényekre is szükség lesz.

Adagolási időszak

26. Megfigyelések szerint a mutációk a kezelések során egyre inkább felhalmozódnak, ezért ismételt dózisú kezelésre van szükség naponkénti kezeléssel 28 napon keresztül. Ez általában elfogadhatónak tekinthető a gyenge mutagének által előidézett mutációk elegendő felhalmozódásához, illetve megfelelő expozíciós időt biztosít a mutációknak a lassan osztódó szervekben való kimutatásához. Egyes értékelésekhez alternatív kezelési sémák is megfelelőek lehetnek, de ezeket az alternatív adagolási sémákat tudományosan meg kell indokolni a protokollban. A kezelések nem lehetnek rövidebbek, mint az összes releváns metabolizáló enzim teljes indukciójához szükséges idő, és a rövidebb kezelések több, a különböző proliferációs sebességű szerveknek megfelelő mintavételi időpontot tehetnek szükségessé. Valamennyi rendelkezésre álló információt (pl. általános toxicitás, metabolizmus és farmakokinetika) fel kell használni a protokoll igazolása során, különösen, ha a protokoll eltér a fenti szabványajánlásoktól. Bár a 8 hétnél hosszabb kezelési idők növelhetik a vizsgálat érzékenységét, ezeket világosan meg kell magyarázni és indokolni, mivel a hosszú kezelési idők a mutációs gyakoriság látszólagos növekedését okozhatják a klonális expanziónak köszönhetően (29).

Dózisszintek

27. A dózisszinteket az általános toxicitást mérő dózisbehatároló vizsgálat eredményeire kell alapozni, amelyet azonos expozíciós módon végeztünk el, vagy pedig a korábbi szubakut toxicitási vizsgálatok eredményeire. A dózistartományok meghatározásához ugyanazon rágcsálótörzsből származó nem transzgenikus állatokat lehet használni. A fő vizsgálat során annak érdekében, hogy dózis-válasz adatokat lehessen gyűjteni, a teljes vizsgálatnak egy negatív kontrollcsoportot is tartalmaznia kell (lásd a 22. bekezdést), valamint legalább három, egymástól megfelelő távolságra elhelyezkedő dózisszintet, kivéve, ha a határdózist használjuk (lásd a 28. bekezdést). A felső

▼M5

dózis a maximális tolerálható dózis (MTD) legyen. Az MTD az a dózis, amely olyan egyértelmű toxicitásjeleket vált ki, hogy annál magasabb adagok, azonos adagolás mellett, várhatóan halált okoznak. A kis nem mérgező dózisban specifikus biológiai aktivitást mutató vegyi anyagok (mint például a hormonok és a mitogének), valamint azok a vegyi anyagok, amelyek a toxikokinetikai tulajdonságok telítődését mutatják, kivételek lehetnek a dózismeghatározási követelmények alól, és eseti alapon kell őket értékelni. Az alkalmazott dózisoknak át kell fogniuk a maximálistól a már csak kissé vagy egyáltalán nem toxikusig terjedő tartományt.

Határdózis-vizsgálat

28. Ha a dózisbehatárolási kísérletek vagy a rokon rágcsálótörzsekből származó adatok azt jelzik, hogy a legalább a határdózist tartalmazó kezelési séma (lásd lentebb) semmilyen megfigyelhető toxikus hatást nem hoz létre, és ha nem várható genotoxicitás a szerkezetileg rokon anyagokkal kapcsolatos adatok alapján, akkor nem szükséges a három dózis használatával végrehajtott teljes vizsgálat. 28 napos adagolási időszak (azaz 28 db napi kezelés) esetén a határdózis 1 000 mg/testtömeg kg/nap. 14 napos vagy annál rövidebb adagolási időszak esetén a határdózis 2 000 mg/testtömeg kg/nap (a 28 napi kezeléstől eltérő adagolási rendeket tudományosan meg kell indokolni a protokollban, lásd a 26. bekezdést).

A dózisok beadása

29. A vizsgált vegyi anyagot rendszerint gyomorszondán keresztül inkubációs kanül segítségével, vagy hasüregbe adott injekció segítségével adjuk be. A vizsgálat tervezése során általánosságban az emberi expozíció várható útvonalát figyelembe kell venni. Ezért az egyéb expozíciós útvonalak (például ivóvíz, szubkután, intravénás, külsőleg, inhalációs, intratracheális, étrendi vagy implantáció) is elfogadhatók lehetnek, amennyiben azokat meg lehet indokolni. Az intraperitoneális injekció nem ajánlott, mivel az nem egy fiziológiailag releváns emberi expozíciós útvonal. A gyomorszondán keresztül vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogat nem haladhatja meg a 2 ml/100 g testtömeg mennyiséget. Az ennél nagyobb mennyiségek használatát meg kell indokolni. A magasabb koncentrációban rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritáló vagy maró vegyi anyagok kivételével a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy a mennyiség valamennyi adagolási szinten konstans legyen.

Mintavételi időpontok

Szomatikus sejtek

30. A mintavételi idő egy kritikus változó, mivel a mutációk rögzüléséhez szükséges időtartam határozza meg. Ez az időtartam szövetspecifikus, és úgy tűnik, hogy kapcsolatban áll a sejtpopuláció kicserélődési idejével, amelynek szempontjából a csontvelő és a belek gyors reagálású, a máj viszont sokkal lassabb reagálású szervnek számít. A mutációs gyakoriságnak mind a gyorsan, mind a lassan osztódó szövetekben való mérésére megfelelő kompromisszum a 28 egymást követő napon történő kezelés (a 26. bekezdésben jelzettek szerint), valamint az utolsó kezelés után három nappal történő mintavétel, bár a maximális mutációs gyakoriság a lassan osztódó szövetekben ilyen körülmények között esetleg nem manifesztálódik. Amennyiben a lassan osztódó szövetek különösen fontosak, a 28 napos adagolási időtartam után 28 nappal történő későbbi mintavétel megfelelőbb lehet (16) (29). Ebben az esetben a későbbi mintavételi időpont felváltja a 3 napos mintavételi időpontot, amit tudományosan is meg kell indokolni.

▼M5

Csírasejtek

31. A TGR-vizsgálatok alkalmasak a génmutáció indukciójának tanulmányozására hím csírasejtekben (7) (8) (27), amelyekben a spermatogenezis időzítését és kinetikáját már pontosan meghatározták (27). Az elemzés céljára még szuperovuláció után is alacsony számban rendelkezésre álló petesejtek, valamint az a tény, hogy a petesejtekben nincs DNS-szintézis, kizárják a mutáció transzgenikus vizsgálattal való meghatározását a női csírasejtekben (31).

32. A hím csírasejtek mintavételi időpontjait úgy kell megválasztani, hogy a kitett sejttípusok széles tartományából lehessen mintát venni a csírasejt-fejlődés teljes folyamatában, illetve úgy, hogy a mintavételben megcélzott szakasz kellő expozícióban részesüljön. A fejlődő csírasejteknek a spermatogoniális őssejtből az érett, az ondóvezetéket/mellékhere farkát elérő spermiummá való progressziójához szükséges időtartam ~49 nap egérben (36) és ~70 nap patkányban (34) (35). Az ondóvezetékből/mellékhere farkából a 28 napos expozíció és a rákövetkező háromnapos mintavételi időszak szerint gyűjtött felhalmozódott sperma (7) (8) fogja képviselni a spermatogenesis nagyjából második felében kitett sejtpopulációt, amely magában foglalja a meiotikus és posztmeiotikus időszakot is, de nem tartalmazza a spermatogoniális vagy őssejt időszakot. Annak érdekében, hogy megfelelően tudjunk mintát venni az ondóvezetékből/mellékhere farkából azokból a sejtekből, amelyek az expozíciós idő alatt még spermatogoniális őssejtek voltak, egy további mintavételi időpontra is szükség van legalább 7 héttel (egér) vagy 10 héttel (patkány) a kezelés befejezését követően.

33. A herecsatornácskákból a 28 + 3 napos kezelési és mintavételi menetrend szerint kinyert sejtek egy kevert populációt tartalmaznak, amelyben a csírasejtek fejlődésének minden szakasza képviselve van (7) (8). Ezeknek a sejteknek a génmutáció kimutatása céljából történő mintavétele nem ad olyan pontos értékelést azokról a szakaszokról, amelyekben a csírasejt-mutációkat előidézték, mint a spermiumoknak az ondóvezetékből/mellékhere farkából való mintavétele (hiszen a tubulusokból vett mintában többféle csírasejt-típus fordul elő, és lesz néhány szomatikus sejt is, amely szennyezi a sejtpopulációt). Ha azonban a herecsatornácskákból való sejtmintavételt az ondóvezetékből/mellékhere farkából származó ondósejtekkel kombinálják, és a mintavételre a 28 + 3 napos mintavételi rend szerint kerül sor, az bizonyos szinten lefedi a csírasejt-fejlődés fázisainak többségében kitett sejteket, és hasznos lehet néhány csírasejt-mutagén kimutatására.

Megfigyelések

34. Naponta legalább egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban általános klinikai megfigyelést kell végezni, figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Fel kell jegyezni a kísérleti állatok klinikai állapotát. Naponta legalább kétszer meg kell vizsgálni az összes állatot megbetegedés és elhullás szempontjából. Minden állat tömegét hetente legalább egyszer, illetve elpusztításkor is le kell mérni. A felvett táplálék mennyiségét heti rendszerességgel le kell mérni. Amennyiben a vizsgált vegyi anyagot az ivóvízzel adjuk be, a vízfogyasztást minden vízcsere alkalmával és legalább hetente le kell mérni. A túlzott toxicitás nem halálos jeleit mutató állatokat a vizsgálati időszak befejezése előtt el kell altatni (23).

▼M5

A szövetek gyűjtése

35. A szövetek gyűjtését világosan meg kell indokolni. Mivel a mutációk indukcióját gyakorlatilag bármilyen szövetben tanulmányozni lehet, a begyűjtendő szövetek kiválasztását a vizsgálat lefolytatásának okára, illetve a vizsgálat alatt álló vegyi anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló mutagenitási, karcinogenitási vagy toxicitási adatokra kell alapozni. A megfontolandó lényeges tényezők közé kell tartoznia a beadás útjának (a valószínű emberi expozíciós útvonal(ak)ra alapozva), a becsült szöveti megoszlásnak, valamint a lehetséges hatásmechanizmusnak. A háttérinformációk hiányában többféle érdekesnek tűnő szomatikus szövetet is kell gyűjteni. Ezeknek gyorsan osztódó, lassan osztódó és az érintkezés helyén található szöveteket is képviselniük kell. Ezenkívül az ondóvezetékből/mellékhere farkából származó ondósejteket és a herecsatornácskákból származó fejlődő csírasejteket (a 32. és 33. bekezdésben leírtak szerint) is össze kell gyűjteni és el kell tárolni arra az esetre, ha a jövőben a csírasejt-mutagenitás elemzésére lenne szükség. A szervek tömegét meg kell mérni, és a nagyobb szervek esetében ugyanazokat a területeket kell begyűjteni az összes állatból.

A szövetek és a DNS tárolása

36. A szöveteket (vagy szövethomogenizátumokat) – 70 °C-on vagy az alatt kell tárolni és 5 éven belül fel kell használni DNS-izolálásra. A hűtőszekrényben 4 °C-on, megfelelő pufferben tárolt izolált DNS-t optimálisan 1 éven belül kell felhasználni mutációanalízisre.

A szövetek kiválasztása mutációanalízisre

37. A szövetek kiválasztásának megfelelő megfontolásokon kell alapulnia, például: 1) a beadási útvonal vagy az első érintkezés helye (pl. mirigyes gyomor, ha az adagolás orális, tüdő, ha az adagolás inhalációs, vagy bőr, ha helyi alkalmazás történt), és 2) az általános toxicitási vizsgálatokban megfigyelt farmakokinetikai paraméterek, amelyek szöveti hajlamot, visszatartást vagy felhalmozódást jeleznek, vagy megmutatják a toxicitás célszerveit. Ha a vizsgálatokat a karcinogenitási vizsgálatok nyomonkövetése céljából végezzük el, a karcinogenitás célszöveteit figyelembe kell venni. A szövetek elemzésre való kiválasztásának maximalizálnia kell azoknak a vegyi anyagoknak a kimutatását, amelyek közvetlenül ható *in vitro* mutagének, gyorsan metabolizálódnak, nagyon reaktívak vagy rosszul szívódnak fel, vagy azokét a vegyi anyagokét, amelyek esetében a beadás módja határozza meg a célszövetet (6).

38. Háttérinformációk hiányában és figyelembe véve az érintkezés helyét a beadás módja alapján, a májat és legalább egy gyorsan osztódó szövetet (pl. mirigyes gyomor, csontvelő) kell értékelni mutagenitás szempontjából. A legtöbb esetben a fenti követelményeket már két gondosan kiválasztott szövet elemzésével teljesíteni lehet, de bizonyos esetekben három vagy több szövetre lehet szükség. Ha jelentősebb ok van arra, hogy csírasejtekre gyakorolt hatásokat feltételezzünk, beleértve a szomatikus sejtek pozitív válaszait is, a csírasejt-szövetek mutációit is vizsgálni kell.

Mérési módszerek

39. A mutációk kimutatására szabványos laboratóriumi vagy publikált módszerek állnak rendelkezésre az ajánlott transzgenikus modellekhez: *lacZ*-lambda bakteriofág és plazmid (30); *lacI*-egér (2) (18); *gpt*-delta egér (22); *gpt*-delta patkány (28); *cII* (17). A módosításokat meg kell indokolni és megfelelően dokumentálni kell. Több csomagolás adatait összesíteni lehet és a plakkok vagy telepek megfelelő számának elérésére lehet használni. Ha azonban nagyszámú csomagolási reakcióra van szükség, hogy elérjük a

▼M5

plakkok megfelelő számát, az rossz minőségű DNS jele lehet. Ilyen esetekben az adatokat óvatosan kell kezelni, mert megbízhatatlanok lehetnek. Az DNS-mintánkénti plakkok vagy telepek optimális száma szempontjából a kellő számú mutáció adott spontán mutációs gyakoriság melletti felderítésének statisztikai valószínűsége az irányadó. Általában legalább 125 000–300 000 plakkra van szükség, ha a spontán mutációs gyakoriság nagyságrendje 3×10^{-5} (15). A Big Blue® *lacI*-vizsgálat esetében fontos annak igazolása, hogy a mutáns szín fenotípusok teljes körét ki lehet mutatni megfelelő színkontrolloknak az egyes vizsgálati lemezekkel párhuzamos alkalmazásával. A szöveteket és a kapott mintákat (elemeket) blokk elrendezés segítségével kell feldolgozni és elemezni, ahol a vivőanyag/oldószer kontrollcsoport elemeit, a pozitív kontrollcsoportot (ha van) vagy a pozitív kontroll DNS-t (adott esetben), valamint minden egyes kezelési csoportot együtt dolgoznak fel.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények feldolgozása

40. Az egyes állatok adatait táblázatban kell összefoglalni. A kísérleti egység maga az állat. A jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell az összes plakk-képző egység (PFU) vagy telepképző egység (cfu) számát, a mutációk számát, valamint a mutációs gyakoriságot az összes állatból származó valamennyi szövet esetében. Ha több csomagolási/tartalék reakciót végeztek, a DNS-mintánkénti reakciók számát jegyzőkönyvezni kell. Noha minden egyes reakció adatait meg kell őrizni, csak a teljes pfu- vagy CFU-értéket szükséges jegyzőkönyvezni. A toxicitásra és a klinikai tünetekre vonatkozó adatokat a 34. bekezdés alapján jegyzőkönyvezni kell. A mutációk szekvenálásának eredményeit, valamint az ebből eredő, az egyes állatokra és szövetekre vonatkozó mutációs gyakorisági számításokat be kell mutatni.

Statisztikai értékelés és az eredmények értelmezése

41. Különböző kritériumok léteznek a pozitív eredmény meghatározására, ilyen például a mutációs gyakoriság növekedése a dózis függvényében vagy a mutációs gyakoriság egyértelmű növekedése egy meghatározott dóziscsoportban az oldószer/vivőanyag kontrollcsoporthoz viszonyítva. Legalább három kezelt dóziscsoportot kell megvizsgálni annak érdekében, hogy elegendő adat álljon rendelkezésre a dózis-válasz elemzéshez. Bár az eredmények biológiai jelentőségének kell az elsődleges szempontnak lennie, megfelelő statisztikai módszereket is lehet alkalmazni a vizsgálati eredmények értékelése során (4) (14) (15) (25) (26). Az alkalmazott statisztikai teszteknek az állatot kell kísérleti egységnek tekinteniük.

42. E vizsgálatban nem mutagén anyagnak tekintendő az a vizsgált vegyi anyag, amely esetében a hozzá tartozó eredmények egyetlen szövetben sem elégítik ki a fenti kritériumokat. A negatív eredmény biológiai jelentőségéhez a szövet expozícióját igazolni kell.

43. A DNS-szekvenálási elemzések esetében számos statisztikai megközelítés áll rendelkezésre az eredmények értelmezéséhez (1) (5) (9) (19).

44. A válaszreakció biológiai jelentőségének értékelésekor támpontot adhat annak mérlegelése, hogy a megfigyelt értékek a kontrollokkal kapott régebbi eredmények tartományába esnek-e (32).

▼M5

Vizsgálati jegyzőkönyv

45. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— azonosítási adatok és CAS-szám, ha ismert,

— forrás és rendelkezésre állás esetén a tételszám,

— fizikai jelleg és tisztaság,

— a vizsgálat elvégzése szempontjából releváns fizikai-kémiai tulajdonságok,

— a vizsgált vegyi anyag stabilitása, ha ismert.

Oldószer/vivőanyag:

— a vivőanyag kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert,

— a takarmány-, ivóvíz- vagy inhalációs készítmények előkészítése,

— a készítmények analitikai vizsgálatai (pl. stabilitás, homogenitás, névleges koncentráció).

Kísérleti állatok:

— a felhasznált faj/törzs és megválasztásuk indokolása,

— az állatok száma, kora és neme,

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.,

— az állatok tömege a vizsgálat kezdetekor, az egyes csoportok esetében a testtömegtartományt, átlagértéket és a szórást is ideértve.

Vizsgálati körülmények:

— a pozitív és negatív (vivőanyag/oldószer) kontrollok adatai,

— a dózisbehatároló vizsgálat adatai,

— az adagolási szintek kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált vegyi anyag előkészítésére vonatkozó részletek,

— a vizsgált vegyi anyag beadására vonatkozó adatok,

— a beadási mód indoklása,

— az állati toxicitás mérésére szolgáló módszerek, beleértve adott esetben a kórszövettani vagy hematológiai elemzéseket, illetve az állatok megfigyelésének és a testtömeg mérésének gyakorisága,

— az annak ellenőrzésére szolgáló módszerek, hogy a vizsgált vegyi anyag elérte-e a célszövetet vagy az általános keringési rendszert, ha negatív eredményt kaptak,

▼M5

— tényleges dózis (mg/testtömeg kg/nap) a vizsgált vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjából (ppm) és a fogyasztásból számítva, ha alkalmazható,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok,

— a kezelési és mintavételi menetrendek részletes leírása és kiválasztásuk indoklása,

— az eutanázia módja,

— a szövetek izolálására és tartósítására használt eljárások,

— a rágcsáló genomiális DNS izolálásának módszerei, a transzgén genomiális DNS-ből történő kinyerése és a transzgenikus DNS-átvitele a bakteriális gazdaszervezetbe,

— valamennyi sejt, készlet és reagens beszerzési forrása és tételszáma (adott esetben).

— a mutációk számolására szolgáló módszerek,

— a mutációk molekuláris elemzésének módszerei és használatuk a klonalitás korrekciójára és/vagy a mutációs gyakoriság kiszámítására, ha van ilyen.

Eredmények:

— az állatok állapota a vizsgálati időszak előtt és alatt, beleértve a toxicitás jeleit,

— a test és a szervek tömege az elaltatáskor,

— az egyes szövetek/állatok esetében a mutációk száma, az értékelt plakkok vagy telepek száma, a mutációs gyakoriság,

— az egyes szövetek/állatcsoportok esetében a csomagolási reakciók DNS-mintánkénti száma, a mutációk száma összesen, az átlagos mutációs gyakoriság, szórás,

— a dózis-válasz kapcsolat, ahol lehetséges,

— az egyes szövetek/állatok esetében a független mutációk száma és az átlagos mutációs gyakoriság, ha a mutációk molekuláris elemzését elvégezték,

— párhuzamos és történeti negatív kontrolladatok tartományokkal, átlagértékekkel és szórásokkal,

— a párhuzamos pozitív kontrollok (vagy a nem párhuzamos DNS-pozitív kontroll) adatai,

— analitikai meghatározások, amennyiben rendelkezésre állnak (pl. a csomagolás során használt DNS-koncentráció, a DNS-szekvenálás adatai),

— statisztikai elemzések és alkalmazott módszerek.

Az eredmények tárgyalása

Következtetések

▼**M5**

SZAKIRODALOM

(1) *Adams,* W.T. and T.R. *Skopek* (1987), 'Statistical *Test* for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol*., 194: 391-396.

(2) Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', *Mutation Res.*, 518: 107–112.

(3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations' *Nature*, 377(6550): 657–659

(4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice'*, Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246–255.

(5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', *Environ. Mol. Mutagen,* 28: 405–413.

(6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens', *Mutagenesis*, 14(1): 141–151.

(7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485-7489.

(8) Douglas, G.R.*,* J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', *Mutation Res.*, 388(2-3): 197-212.

(9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', *Genetics*, 156: 1411–1418.

(10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo*'*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 86(20): 7971–7975.

(11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), 'A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host', *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.

(12) Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res.*, 543: 125-136.

(13) Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, 705: 96-106.

(14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), 'Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', *Mutagenesis*, 13(3): 249–255.

(15) Heddle, J.A.*,* S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen*., 35: 253-259.

(16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), 'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1-6.

▼**M5**

(17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), 'Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073–9078.

(18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing', Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8): 212–218.

(19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', Carcinogenesis, 29(4): 772-778.

(20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi – and 6-thioguanine Selections', Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 465–470.

(21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), 'Spi $^-$ Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*., 34(1): 9–15.

(22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.

(23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N^{o}19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N^o 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.

(25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', Environ. Mol. Mutagen., 25(3): 231–245.

(26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', Mutation. Res., 388(2–3): 249–289.

(27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', Mutation. Res., 598: 164-193.

(28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), 'Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', Toxicol. Sci., 114(1): 71-78.

(29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res*., 540: 141-151.

(30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations *in vivo*' in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II,* Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 391–410.

▼**M5**

(31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), 'A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res*., 578(1-2): 117-123.

(32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), „Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

(33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N^{o} 145, ENV/JM/MO-NO(2011)20, OECD, Paris.

(34) Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal'. Physiol. Rev. 52: 198-236.

(35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M, Wassarman (eds.), Physiology of Reproduction, Elsevier, the Netherlands, pp. 1071-1148.

(36) Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', Genetica, 122: 25–36.

▼M5

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Adagolási időszak: az a teljes időszak, amely alatt az állatot kezelik.

Bázispár cseréje: olyan típusú mutáció, amely egyetlen DNS nukleotid bázisnak egy másik DNS nukleotid bázissal való cseréjét okozza.

Kapszid: a vírusrészecskét körülvevő fehérjeburok.

Vegyi anyag: egy anyag vagy keverék.

Klonális expanzió: sok sejt előállítása egyetlen (mutáns) sejtből.

Kolóniaképző egység (cfu): az életképes baktériumok mérőszáma.

Konkatamer: hosszú, folytonos biomolekula, amely sorba kapcsolódott több azonos másolatból áll.

Cos-hely: 12 nukleotidból álló egyszálú DNS-szegmens, amely a lambda bakteriofág dupla szálú genomának mindkét végén megtalálható.

Deléció: olyan mutáció, amelyben egy vagy több (szekvenciális) nukleotid elvész a genomból.

Elektroporáció: elektromos impulzusok alkalmazása abból a célból, hogy növelje a sejtmembránok permeabilitását.

Endogén gén: a genomban őshonos gén.

Extra-binomiális variáció: egy populáció arányának az ismételt becslések során mutatkozó nagyobb változékonysága, mint ami várható lenne, ha a populációnak a binomiális eloszlása lenne.

Frameshift mutáció: számos nukleotid inszerciója vagy delécióját által okozott olyan genetikai mutáció, amely nem osztható maradék nélkül hárommal, egy olyan DNS-szekvencián belül, amely egy fehérjét/peptidet kódol.

Inszerció: egy vagy több nukleotid bázispár hozzáadása egy DNS-szekvenciához.

Jackpot: nagyszámú mutáció, amelyek klonális expanzió révén keletkeztek egyetlen mutációból.

Nagy deléciók: több kilobázis méretű deléciók a DNS-ben (amelyek hatékonyan kimutathatók a Spi$^-$ szelekciós és a *lacZ*-plazmid vizsgálatokkal).

Ligálás: DNS-molekulák két végének kovalens összekapcsolása DNS-ligáz alkalmazásával.

Mitogén: olyan vegyi anyag, amely arra serkenti a sejtet, hogy sejtosztódásba kezdjen, kiváltva ezzel a mitózist (azaz a sejtosztódást).

Semleges gén: olyan gén, amelyet nem befolyásolnak a pozitív vagy negatív szelekciós nyomások.

Csomagolás: fertőző fágrészecskék szintézise fágkapszidból és farokfehérjékből, valamint fág DNS-molekulák konkatamerjéből álló készítményből. Általánosan használják a lambda-vektorra klónozott (cos-helyekkel elválasztott) DNS-nek a fertőző lambda-részecskékbe való becsomagolására.

Csomagolási hatékonyság: az a hatékonyság, amellyel a csomagolt bakteriofágokat visszanyerik a gazdabaktériumokban.

▼**M5**

Plakk-képző egység (pfu): az életképes bakteriofágok mérőszáma.

Pontmutáció: általános fogalom, amely a DNS-szekvencia csak egy kis részét érintő mutációkat foglalja magában, beleértve a kis inszerciókat, deléciókat és bázispár-szubsztitúciókat.

Pozitív szelekció: olyan módszer, amely csak a mutációk túlélését teszi lehetővé.

Riporter gén: olyan gén, amelynek mutációs génterméke könnyen kimutatható.

Mintavételi idő: annak az időszaknak a vége az állat elpusztítása előtt, amelynek során a vegyi anyagot nem adagolják és amelynek során a feldolgozatlan DNS-léziók stabil mutációként rögzülnek.

Shuttle vektor: oly módon felépített vektor, amely két különböző gazdafajban is szaporodni tud; ennek megfelelően a shuttle vektorba illesztett DNS-t két különböző sejttípusban vagy két különböző élőlényben is lehet tesztelni vagy manipulálni.

Vizsgált vegyi anyag: Bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Transzgenikus: olyan szervezet, amelynek genomja egy másik faj génjének vagy génjeinek átültetése révén megváltozott.”

▼M7

B.59. *IN CHEMICO* BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: KÖZVETLEN PEPTIDREAKTIVITÁSI VIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 442C. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A bőrszenzibilizáló anyag a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS) (1) és az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendelet ([1]) (CLP-rendelet) szerint olyan anyag, amely a bőrrel való érintkezést követően allergiás reakciót vált ki. Ez a vizsgálati módszer olyan *in chemico* eljárást (közvetlen peptidreaktivitási vizsgálat, a továbbiakban: DPRA) tesz lehetővé, amellyel elősegíti a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetését az ENSZ-GHS-nek és a CLP-rendeletnek megfelelően.

A bőrszenzibilizációt előidéző főbb biológiai eseményeket illetően általános egyetértés van. A bőrszenzibilizációhoz kapcsolódó kémiai és biológiai mechanizmusokról már rendelkezésre álló ismereteket úgynevezett káros kimeneti út (Adverse Outcome Pathway, AOP) (2) foglalja össze a molekuláris kiváltó eseménytől a köztes eseményeken át a káros hatásig, amely embereknél allergiás kontakt bőrgyulladás, rágcsálóknál pedig kontakt túlérzékenység. A bőrszenzibilizációs káros kimeneti út esetében a molekuláris kiváltó esemény az elektrofil anyagok és a bőrben lévő fehérjék nukleofil centrumai között létrejövő kovalens kötés.

A bőrszenzibilizáció vizsgálata jellemzően kísérleti állatokon történő vizsgálatot foglal magában. A tengerimalacokon alkalmazott klasszikus módszerek, vagyis a Magnusson–Kligman-féle tengerimalac-maximizációs vizsgálat és a Bühler-féle vizsgálat (B.6. vizsgálati módszer (3)) egyaránt a bőrszenzibilizáció indukciós és kiváltási fázisával foglalkozik. Az egereken alkalmazott lokális nyirokcsomóvizsgálati módszer (LLNA, B.42. vizsgálati módszer (4)) és két nem radioaktív változata, az LLNA: DA (B.50. vizsgálati módszer (5)) és az LLNA: BrdU-ELISA (B.51. vizsgálati módszer (6)), amely mind csak az indukciós reakciót vizsgálja, szintén elfogadottá vált, mivel állatjólét szempontjából előnyösebbek, mint a tengerimalacon végzett vizsgálatok, és objektív mérést tesznek lehetővé a bőrszenzibilizáció indukciós fázisában.

Újabban a mechanisztikus alapú *in chemico* és *in vitro* vizsgálati módszerek a vegyi anyagok bőrszenzibilizációs veszélyének értékelése szempontjából tudományosan megalapozottnak tekinthetőek. Szükség lesz azonban nem állatokon alkalmazott módszerek (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) integrált vizsgálati és értékelési megközelítésen belüli kombinációira a jelenleg alkalmazott állatkísérletek teljes felváltásához, mivel a jelenleg rendelkezésre álló, nem állatokon alkalmazott vizsgálati módszerekre a káros kimeneti út mechanisztikus szempontjai csak korlátozott mértékben terjednek ki (2) (7).

A bőrszenzibilizációs káros kimeneti út molekuláris kiváltó eseményét, vagyis a fehérjereaktivitást illetően a DPRA alkalmazása javasolt, amelynek keretében a vizsgálati vegyi anyagok reaktivitását a lizint vagy ciszteint tartalmazó szintetikus peptidmodellekhez viszonyítva kell számszerűsíteni (8). Ezt követően a cisztein és a lizin százalékos peptidkiürülési értékei alapján az anyag besorolható a négy reaktivitási osztály egyikébe, amivel támogatható a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetése (9).

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 2008. december 16-i 1272/2008/EK rendelete az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353., 2008.12.31., 1. o.).

▼M7

A DPRA-t az állatkísérletek alternatív módszereinek uniós referencialaboratóriuma (EURL ECVAM) által irányított validálási vizsgálatban értékelték, az EURL ECVAM tudományos tanácsadó bizottsága (ESAC) pedig független szakértői értékelésnek vetette alá; mindezek alapján megállapítást nyert, hogy a DPRA tudományosan megalapozott (10) ahhoz, hogy integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének támogatására lehessen felhasználni veszélyességi osztályozás és címkézés céljából. A DPRA-ból származó adatok és más információk együttes használatára fellelhetők példák a szakirodalomban (11) (12) (13) (14).

A fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK, ALKALMAZHATÓSÁG ÉS KORLÁTOK

A fehérjereaktivitás és a bőrszenzibilizáló potenciál közötti összefüggés jól ismert (15) (16) (17). Mindazonáltal, mivel a fehérjekötés csak egy kulcsfontosságú esemény, jóllehet a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út molekuláris kiváltó eseménye, a fehérjereaktivitásról vizsgálati és vizsgálat nélküli módszerekkel előállított információk önmagukban nem feltétlenül elegendőek ahhoz, hogy megállapítható legyen a vegyi anyagok bőrszenzibilizáló potenciáljának hiánya. Ezért az e vizsgálati módszerrel kapott adatokat integrált megközelítés, például integrált vizsgálati és értékelési megközelítés összefüggésében kell mérlegelni olyan egyéb, kiegészítő információkkal együtt, mint a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út más kulcsfontosságú eseményeivel foglalkozó *in vitro* vizsgálatok eredményei, valamint a vizsgálat nélküli módszerekkel, köztük a kémiai analógokból kereszthivatkozással kapott adatok.

Ez a vizsgálati módszer az integrált vizsgálati és értékelési megközelítéssel összefüggésben egyéb, kiegészítő információkkal együtt alkalmazva felhasználható a bőrszenzibilizáló (vagyis az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének támogatására. Ez a vizsgálati módszer nem alkalmazható önmagában sem a bőrszenzibilizáló anyagoknak az ENSZ-GHS-ben/a CLP-rendeletben meghatározott 1A. és 1B. alkategóriába sorolására, sem a hatáserősség előrejelzésére a biztonsági értékeléssel kapcsolatos döntések esetén. A szabályozási kerettől függően azonban a DPRA pozitív eredménye önmagában is felhasználható a vegyi anyagok ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába sorolására.

A DPRA vizsgálati módszerről bebizonyosodott, hogy áthelyezhető a nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiával (HPLC) végzett elemzés területén tapasztalattal rendelkező laboratóriumokba. A vizsgálati módszertől várható előrejelzések reprodukálhatóságának mértéke a laboratóriumokon belül 85 %, a laboratóriumok között pedig 80 % (10). A validálási vizsgálatban (18) és a közzétett tanulmányokban (19) kapott eredmények összességében azt jelzik, hogy a DPRA a szenzibilizáló (azaz az ENSZ-GHS/a CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) anyagokat az LLNA vizsgálati módszer eredményeihez képest 80 %-os (N=157) pontossággal különbözteti meg a nem szenzibilizáló anyagoktól, 80 % az érzékenysége (88/109), a specifikussága pedig 77 % (37/48). A DPRA nagyobb valószínűséggel jelez előre alacsonyabb értékeket olyan vegyi anyagoknál, amelyeknek alacsonytól mérsékeltig terjedő a szenzibilizáló hatása (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1B. alkategóriába tartozó anyagoknál), mint a rendkívül bőrszenzibilizáló hatást mutató vegyi anyagoknál (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1A. alkategóriába tartozó anyagoknál) (18) (19). A DPRA mint önálló vizsgálati módszer esetében itt megadott pontossági értékek azonban csak irányadóak, ugyanis a vizsgálati módszert az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében más információforrásokkal együtt és a fenti 9. pont rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni. Ezen túlmenően a bőrszenzibilizáció nem állatokon alkalmazott módszereinek értékelésekor nem szabad megfeledkezni arról, hogy az LLNA vizsgálat, valamint más állatkísérletek nem feltétlenül tükrözik teljes egészében az érintett fajnál, például az embernél fennálló helyzetet. Az összes rendelkezésre álló adat alapján a DPRA-ról bebizonyosodott, hogy különféle szerves funkciós csoportokat, reakciómechanizmusokat, (*in vivo* vizsgálatok során meghatározott) bőrszenzibilizáló hatásokat és fizikai-kémiai tulajdonságokat képviselő vizsgálati vegyi anyagokra alkalmazható (8) (9) (10) (19). Ezek az információk összességében azt jelzik, hogy a DPRA érdemben hozzájárul a bőrszenzibilizáció veszélyének azonosításához.

▼M7

E vizsgálati módszer esetében a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezés a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra vonatkozik, nem a DPRA anyagok és/vagy keverékek vizsgálatára való alkalmazhatóságához kapcsolódik. Ez a vizsgálati módszer fémvegyületek vizsgálatára nem alkalmazandó, mivel ismert, hogy azok kovalens kötéstől elérő mechanizmusok útján lépnek reakcióba a fehérjékkel. A vizsgálati vegyi anyagnak 100 mM végső koncentrációjú, megfelelő oldószerben oldhatónak kell lennie (lásd a 18. pontot). Az említett koncentrációnál nem oldható vizsgálati vegyi anyagok azonban alacsonyabb oldható koncentrációkban még vizsgálhatók. Ilyen esetben a pozitív eredmény továbbra is felhasználható a vizsgálati vegyi anyag bőrszenzibilizáló hatásúként történő azonosítására, a negatív eredmény alapján azonban nem szabad a reakcióképesség hiányára következtetni. Jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a DPRA ismert összetételű keverékekre való alkalmazhatóságával kapcsolatban (18) (19). A DPRA mindazonáltal technikailag alkalmazandónak tekinthető az ismert összetételű, több összetevőből álló anyagok és keverékek vizsgálatára (lásd a 18. bekezdést). E vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény. A jelenlegi előrejelzési modell a vizsgálati vegyi anyag és a peptid meghatározott mólaránya miatt nem alkalmazható ismeretlen összetételű, összetett keverékekre, ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagokra (azaz az UVCB anyagokra). E célból új, gravimetriás megközelítésen alapuló előrejelzési megközelítést kell kidolgozni. Olyan esetekben, ha bizonyítékkal igazolható, hogy a vizsgálati módszer nem alkalmazható más, konkrét vegyianyag-kategóriákra, a vizsgálati módszert nem szabad e vegyianyag-kategóriákra alkalmazni.

Ez a vizsgálati módszer a metabolikus rendszert nem érintő *in chemico* módszer. E vizsgálati módszerrel nem mutathatók ki olyan vegyi anyagok, amelyek enzimatikus bioaktivációt igényelnek a bőrszenzibilizáló potenciáljuk kifejtéséhez (azaz a pro-haptének). Beszámolók szerint az abiotikus átalakulást követően szenzibilizálóvá váló vegyi anyagok (azaz a pre-haptének) egyes esetekben megfelelően kimutathatók ezzel a vizsgálati módszerrel (18). A fentiek fényében: a vizsgálati módszerrel kapott negatív eredményeket a közölt korlátokra tekintettel és az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretébe tartozó egyéb információforrásokkal összefüggésben kell értelmezni. A peptidhez nem kovalens kötéssel kapcsolódó, de az oxidációjához (cisztein-dimerizációval) hozzájáruló vizsgálati vegyi anyagok a peptidkiürülés esetleges túlbecsléséhez vezethetnek, esetlegesen hamis pozitív előrejelzéseket és/vagy magasabb reaktivitási osztályba sorolást eredményezve (lásd a 29. és a 30. pontot).

A fentieknek megfelelően a DPRA a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetését támogatja. Hozzájárulhat azonban a szenzibilizáló hatás értékeléséhez is (11), ha az integrált vizsgálati és értékelési megközelítéshez hasonló integrált megközelítések keretében alkalmazzák. Lehetőleg humán adatokon alapuló további munkára van azonban szükség annak meghatározásához, hogy a DPRA eredményei hogyan járulhatnak hozzá a hatáserősség vizsgálatához.

A VIZSGÁLAT ELVE

A DPRA a cisztein- vagy lizintartalmú peptidek vizsgálati vegyi anyaggal 25±2,5 °C-on 24 óráig végzett inkubációt követően megmaradó koncentrációját számszerűsítő *in chemico* módszer. A szintetikus peptidek a kimutatás elősegítése érdekében fenilalanint tartalmaznak. A relatív peptidkoncentráció mérése gradiens elúcióval és 220 nm hullámhosszon UV-detektálással végzett nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiával (HPLC) történik. A cisztein- és a lizintartalmú peptidek százalékos kiürülési értékeit ezt követően ki kell számítani és előrejelzési modellben kell alkalmazni (lásd a 29. pontot), ami lehetővé teszi a vizsgálati vegyi anyagnak a szenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok közötti különbségtétel alátámasztására használt négy reaktivitási osztály egyikébe sorolását.

▼M7

Az e vizsgálati módszerben ismertetett módszer rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak a 2. függelékben felsorolt tíz jártassági tesztanyag felhasználásával kell igazolniuk szakmai jártasságukat.

ELJÁRÁS

Ez a vizsgálati módszer a DPRA-ra vonatkozó 154. sz. DB-ALM protokollon (20) alapul, amely az EURL ECVAM által koordinált validálási vizsgálathoz használt protokoll. A módszer laboratóriumi végrehajtása és alkalmazása során e protokoll alkalmazása ajánlott. Az alábbiakban a DPRA főbb összetevőinek és eljárásainak leírása található. Alternatív HPLC-beállítás alkalmazása esetén annak DB-ALM protokollban ismertetett, validált rendszerrel való egyenértékűségét bizonyítani kell (például a 2. függelékben található jártassági tesztanyagok vizsgálatával).

A cisztein- illetve a lizintartalmú peptidek előkészítése

A ciszteintartalmú (Ac-RFAA**C**AA-COOH) és lizintartalmú (Ac-RFAA**K**AA-COOH), 85 %-osnál nagyobb és lehetőleg 90–95 %-os tisztaságú szintetikus peptideket tartalmazó törzsoldatokat frissen kell elkészíteni, közvetlenül a vizsgálati vegyi anyaggal való inkubálásukat megelőzően. A ciszteintartalmú peptidek végső koncentrációjának 7,5 pH-jú foszfátpufferben 0,667 mM-nek, míg a lizintartalmú peptidek végső koncentrációjának 10,2 pH-jú ammónium-acetát pufferben 0,667 mM-nek kell lennie. A HPLC-vizsgálatmenet sorozatát úgy kell beállítani, hogy a HPLC-elemzés ideje 30 óránál rövidebb maradjon. A validálási vizsgálatban használt és az e vizsgálati módszerben ismertetett HPLC-rendszerhez egyetlen HPLC-vizsgálatmenetben legfeljebb 26 elemzési minta alkalmazható (amelyek magukban foglalják a vizsgálati vegyi anyagot, a pozitív kontrollt és a megfelelő számú oldószeres kontrollokat a vizsgálat során használt oldószerek száma alapján; minden mintát három példányban kell vizsgálni). Az ugyanazon vizsgálatmenetben elemzett összes párhuzamoshoz ugyanazokat a cisztein- és lizintartalmú peptideket tartalmazó törzsoldatokat kell felhasználni. Az egyes gyártási sorozatokból származó peptidek esetében a felhasználás előtt ajánlott bebizonyítani a megfelelő oldhatóságukat.

A vizsgálati vegyi anyag előkészítése

A vizsgálati vegyi anyag megfelelő oldószerben való oldhatóságát a DPRA DB-ALM protokolljában (20) ismertetett szolubilizációs eljárás utáni vizsgálat végrehajtása előtt kell vizsgálni. Egy megfelelő oldószer teljes egészében feloldja a vizsgálati vegyi anyagot. Mivel a DPRA során a vizsgálati vegyi anyag inkubálása túlnyomórészt a cisztein- vagy lizintartalmú peptidekkel történik, az áttetsző oldat képződésének szemrevételezéses ellenőrzése elegendőnek tekintendő annak megállapításához, hogy a vizsgálati vegyi anyag (és több összetevőből álló anyag vagy keverék vizsgálata esetén a vizsgálati vegyi anyag valamennyi összetevője) feloldódik. Megfelelő oldószer az acetonitril, a víz, illetve a víz és az acetonitril 1:1 arányú keveréke, az izopropanol, az aceton vagy az aceton és az acetonitril 1:1 arányú keveréke. Más oldószerek akkor alkalmazhatók, ha nem fejtenek ki hatást a peptid C. referenciakontrollokkal (azaz a megfelelő oldószerben feloldott, csak peptidből álló mintákkal; lásd a 3. függeléket) nyomon követett stabilitására. Utolsó lehetőségként, ha a vizsgálati vegyi anyag nem oldható ezen oldószerek egyikében sem, kísérletet kell tenni 300 µL dimetil-szulfoxidban való szolubilizálására, a keletkezett oldatot pedig 2 700 µL acetonitrillel kell hígítani, és ha a vizsgálati vegyi anyag nem oldható ebben a keverékben, kísérletet kell tenni ugyanakkora mennyiségű vizsgálati vegyi anyag 1 500 µL dimetil-szulfoxidban való szolubilizálására, a keletkezett oldatot pedig 1 500 µL acetonitrillel kell hígítani. 100 mM koncentrációjú oldat elkészítéséhez a vizsgálati vegyi anyagot előzetesen ki kell mérni üvegfiolákba és közvetlenül a vizsgálata előtt megfelelő oldószerben fel kell oldani. Ismert összetételű keverékek és több összetevőből álló anyagok esetében az összetevők (a víz kivételével) arányának összegzésével egyetlen tisztaságot kell meghatározni, továbbá a keverék minden egyes összetevője (a víz kivételével) molekulatömegének és azok

▼M7

egyedi arányának figyelembevételével egyetlen látszólagos molekulatömeget kell meghatározni. Ezt követően a kapott tisztaságot és látszólagos molekulatömeget kell felhasználni a vizsgálati vegyi anyag 100 mM koncentrációjú oldat elkészítéséhez szükséges tömegének kiszámításához. Olyan polimerek esetében, amelyeknél a domináns molekulatömeg nem határozható meg, 100 mM koncentrációjú oldat elkészítéséhez figyelembe vehető a monomer molekulatömege (vagy polimert alkotó különféle monomerek látszólagos molekulatömege). Ismert összetételű keverékek, több összetevőből álló anyagok vagy polimerek vizsgálata során azonban mérlegelni kell a tiszta vegyi anyag vizsgálatát is. Folyadékok esetében a tiszta vegyi anyagot önmagában, előzetes hígítás nélkül, a ciszteintartalmú peptidekkel 1:10, illetve a lizintartalmú peptidekkel 1:50 mólarányban végzett inkubálással kell vizsgálni. Szilárd anyagok esetében a vizsgálati vegyi anyagot a látszólagos 100 mM koncentrációjú oldat elkészítéséhez használt oldószerrel megegyező oldószerben, maximális oldható koncentrációjában kell feloldani. Ezt követően önmagában, további hígítás nélkül, a ciszteintartalmú peptidekkel 1:10, illetve a lizintartalmú peptidekkel 1:50 arányban végzett inkubálással kell vizsgálni. A látszólagos 100 mM koncentrációjú oldat és a tiszta vegyi anyag egyező eredményeinek (reaktív vagy nem reaktív) az eredményre vonatkozó határozott következtetést kell lehetővé tenniük.

A pozitív kontroll, a referenciakontrollok és a koelúciós kontrollok elkészítése

Pozitív kontrollként acetonitrilben oldott, 100 mM koncentrációjú fahéjaldehidet (CAS-szám: 104-55-2; ≥95 %-os élelmiszer-minőségű tisztaság) kell alkalmazni. Alkalmazhatók más, lehetőleg középtartományba eső kiürülési értékeket biztosító, megfelelő pozitív kontrollok is, ha rendelkezésre állnak történeti adatok hasonló vizsgálatmenet-elfogadhatósági kritériumok származtatásához. A HPLC-vizsgálatmenet sorozatának ezenfelül referenciakontrollokat (azaz mindössze a megfelelő oldószerben feloldott peptidet tartalmazó mintákat) is tartalmaznia kell, amelyek a HPLC rendszer alkalmasságának a vizsgálat előtti ellenőrzésére (A. referenciakontrollok), a referenciakontrollok időbeli stabilitásának ellenőrzésére (B. referenciakontrollok), valamint annak ellenőrzésére használatosak, hogy a vizsgálati vegyi anyag feloldására alkalmazott oldószer nincs hatással a százalékos peptidkiürülésre (C. referenciakontrollok) (lásd a 3. függeléket). Az egyes vegyi anyagok tekintetében a megfelelő referenciakontroll használatos az adott vegyi anyagok százalékos peptidkiürülésének kiszámításához (lásd a 26. pontot). Ezenfelül a vizsgálatmenet-sorozatnak minden egyes elemzett vizsgálati vegyi anyag esetében kizárólag a vizsgálati vegyi anyaggal alkotott koelúciós kontrollt kell tartalmaznia a vizsgálati vegyi anyag lizintartalmú vagy ciszteintartalmú peptidekkel való lehetséges koelúciójának kimutatására.

A vizsgálati vegyi anyag ciszteintartalmú és lizintartalmú peptideket tartalmazó oldatokkal való inkubálása

A ciszteintartalmú peptideket tartalmazó oldatokat 1:10 arányban, a lizintartalmú peptideket tartalmazó oldatokat pedig 1:50 arányban kell automata mintaadagoló üvegfiolákban inkubálni a vizsgálati vegyi anyaggal. Ha a vizsgálati vegyi anyag alacsony vízoldékonysága miatt a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó oldat peptidoldathoz történő hozzáadásakor azonnal kicsapódás figyelhető meg, ebben az esetben nem lehet megbizonyosodni arról, hogy a vizsgálati vegyi anyagból mennyi maradt az oldatban ahhoz, hogy a peptiddel reakcióba lépjen. Ezért ilyen esetben a pozitív eredmények még felhasználhatóak, a negatív eredmények azonban bizonytalanok és kellő körültekintéssel értelmezendőek (a 100 mM koncentrációig nem oldható vegyi anyagok vizsgálatához lásd még a 11. pont rendelkezéseit). A reakcióoldatot a HPLC-elemzés lefuttatása előtt 24±2 óráig 25±2,5 °C-on, sötétben kell hagyni. Minden egyes vizsgálati vegyi anyagot mindkét peptid esetében három példányban kell elemezni. A HPLC-elemzés előtt a mintákat szemrevételezéssel kell ellenőrizni. Ha kicsapódás vagy fáziszétválás figyelhető meg, a mintákat elővigyázatosságból alacsony sebességen (100–400xg) centrifugálni lehet, hogy a kicsapódás a fiola aljára kerüljön, ugyanis a nagy mennyiségű kicsapódás eltömítheti a HPLC-csöveket vagy -oszlopokat. Ha az inkubációs időszak után kicsapódás vagy fázisszétválás figyelhető meg, a peptidkiürülés esetlegesen alulbecsülhető, és a reaktivitás hiányra vonatkozó következtetés nem vonható le kellő bizonyossággal negatív eredmény esetén.

▼M7

A HPLC standard kalibrációs görbe elkészítése

A ciszteintartalmú és a lizintartalmú peptidekhez is standard kalibrációs görbét kell létrehozni. A peptidstandardokat 20 %-os vagy 25 %-os acetonitril-oldatban kell előkészíteni: a ciszteintartalmú peptidek esetében (7,5 pH-jú) foszfátpufferrel, a lizintartalmú peptidek esetében pedig (10,2 pH-jú) ammónium-acetát pufferrel előállított pufferben. A (0,667 mM koncentrációjú) peptid-törzsoldat sorozathígítási standardjainak alkalmazásával 6 kalibráló oldatot kell készíteni a 0,534–0,0167 mM közötti tartomány lefedése érdekében. A standard kalibrációs görbén a hígítópuffer vakpróbáját is fel kell tüntetni. Megfelelő kalibrációs görbék esetén $r^2 > 0,99$.

A HPLC előkészítése és HPLC-elemzés

A HPLC-rendszer megfelelőségét ellenőrizni kell az elemzés elvégzése előtt. A peptidkiürülést UV-detektorral (fotodiódasoros detektorral vagy 220 nm-en küldött jellel működő hullámhossz-abszorbancia-detektorral) ellátott HPLC segítségével kell nyomon követni. A megfelelő oszlopot telepíteni kell a HPLC-rendszerbe. A validált protokollban ismertetett HPLC-beállítás előnyben részesített oszlopként Zorbax SB-C-18 típusú, 2,1 mm x 100 mm x 3,5 mikron méretű oszlopot alkalmaz. Az egész rendszert a működtetése előtt legalább két órán keresztül ezzel a fordított fázisú HPLC-oszloppal kell 30 °C-on 50 % A. fázissal (0,1 térfogatszázalék trifluoracetát-sav vízben) és 50 % B. fázissal (0,0,85 térfogatszázalék trifuloracetát-sav acetonitrilben) ekvilibrálni. A HPLC-elemzést 0,35 ml/perc áramlási sebesség mellett, lineáris gradiensként 10 percen keresztül 10–25 %-os acetonitrilt alkalmazva kell elvégezni oly módon, hogy ezután az egyéb anyagok eltávolítása érdekében gyorsan 90 %-osra kell növelni az acetonitrilt. Az egyes standardokból, mintákból és kontrollokból egyenlő mennyiséget kell befecskendezni. Az oszlopot a befecskendezések között hét percig az eredeti körülmények között újra ekvilibrálni kell. Eltérő fordított fázisú HPLC alkalmazása esetén a fent ismertetett beállítási paramétereket esetlegesen ki kell igazítani a cisztein- és a lizintartalmú peptidek megfelelő elúciójának és integrációjának biztosítása érdekében, esetlegesen ki kell igazítani a befecskendezett mennyiséget is, amely az alkalmazott rendszertől függően változhat (jellemzően 3–10 µl tartományban mozoghat). Fontos, hogy alternatív HPLC-beállítás alkalmazása esetén a fent ismertetett, validált beállítással való egyenértékűségét bizonyítani kell (például a 2. függelékben található jártassági tesztanyagok vizsgálatával). Az abszorbanciát 220 nm hullámhosszon kell nyomon követni. Fotodiódasoros detektor használata esetén a 258 nm-en mért abszorbanciát is rögzíteni kell. Megjegyzendő, hogy egyes acetonitril-szállítmányok negatív hatást fejthetnek ki a peptidek stabilitására, és ezt figyelembe kell venni az új gyártási sorozatból származó acetonitril használatakor. A 220-as csúcsterület és a 258-as csúcsterület aránya a koelúció mutatójaként használható. Az egyes minták esetében a 90 % <kontrollminták területi mutatójának átlaga ([1])<100 % közötti tartományba eső mutató megbízhatóan jelezheti, hogy nem következett be koelúció.

Egyes vizsgálati vegyi anyagok kiválthatják a ciszteintartalmú peptid oxidációját. A dimerizált ciszteintartalmú peptid csúcsa szemrevételezéssel ellenőrizhető. Ha úgy tűnik, hogy a dimerizáció bekövetkezett, ezt fel kell jegyezni, mivel a százalékos peptidkiürülés túlbecsülhető, ami hamis pozitív előrejelzésekhez és/vagy magasabb reaktivitási osztályba soroláshoz vezethet (lásd a 29. és 30. pontot).

A cisztein- és a lizintartalmú peptidek esetében a HPLC-elemzés egyidejűleg (ha két HPLC-rendszer áll rendelkezésre) vagy különböző napokon is elvégezhető. Ha az elemzésre különböző napokon kerül sor, mindkét napon frissen kell elkészíteni a vizsgálati vegyi anyagokat tartalmazó összes oldatot. Az elemzést úgy kell időzíteni, hogy biztosítható legyen az, hogy az első minta injektálása 22–26 órával a vizsgálati vegyi anyag peptidoldattal való elegyítését követően

([1]) Átlag alatt a dokumentum egészében számtani átlag értendő.

▼M7

kezdődjön meg. A HPLC-vizsgálatmenet sorozatát úgy kell beállítani, hogy a HPLC-elemzés ideje 30 óránál rövidebb maradjon. A validálási vizsgálatban használt és az e vizsgálati módszerben ismertetett HPLC-beállítás legfeljebb 26 elemzési mintához alkalmazható egyetlen HPLC-vizsgálatmenetben (lásd még a 17. pontot). A HPLC-elemzési sorozat egy példája a 3. függelékben található.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az adatok kiértékelése

A cisztein- és a lizintartalmú peptid koncentrációját minden egyes mintában 220 nm-en kell fotometrikusan meghatározni a megfelelő csúcsok csúcsterületének (görbe alatti terület, AUC) mérésével és a peptid koncentrációjának a standardokból származtatott lineáris kalibrációs görbe segítségével történő kiszámításával.

A százalékos peptidkiürülést minden egyes mintában a csúcsterület mérésével, majd ennek a releváns C. referenciakontrollok (lásd a 3. függeléket) csúcsterület-átlagával, az alább ismertetett képlet szerint kell meghatározni.

$$Százalékos\ peptidkiürülés = \left[1 - \left(\frac{Peptid\ csúcsterület\ a\ párhuzamosok\ injekciójában}{C.referenciakontroll\ csúcsterület - átlaga}\right)\right] \times 100$$

Elfogadhatósági kritériumok

Ahhoz, hogy a vizsgálatmenet érvényesnek minősüljön, az alábbi kritériumoknak kell teljesülniük:

a. a standard kalibrációs görbe esetén $r^2 > 0{,}99$,

b. a pozitív kontrollként szolgáló fahéjaldehid három párhuzamosa százalékos peptidkiürülési átlaga a ciszteintartalmú peptid esetében 60,8 % és 100 % között, a lizintartalmú peptid esetében pedig 40,2 % és 69,0 % között legyen, a pozitív kontrollként szolgáló párhuzamosoknál a maximális szórás 14,9 %-nál kisebb legyen a százalékos ciszteinkiürülés esetében és 11,6 %-nál kisebb legyen a százalékos lizinkiürülés esetében, továbbá

c. az A. referenciakontrollok peptidkoncentráció-átlagának 0,50±0,05 mM értékűnek kell lennie, az acetonitrilben lévő kilenc B. és C. referenciakontroll peptid-csúcsterülete variációs koefficiensének 15,0 %-nál alacsonyabbnak kell lennie.

Ha e kritériumok közül egy vagy több nem teljesül, a vizsgálatmenetet meg kell ismételni.

Ahhoz, hogy a vizsgálati vegyi anyag eredményei érvényesnek minősüljenek, az alábbi kritériumoknak kell teljesülniük:

a. a vizsgálati vegyi anyag párhuzamosai maximális szórásának a százalékos ciszteinkiürülés esetében 14,9 %-nál alacsonyabbnak, a százalékos lizinkiürülésnek pedig 11,6 %-nál alacsonyabbnak kell lennie,

b. a megfelelő oldószerben lévő három C. referenciakontroll peptidkoncentrációja átlagának 0,50±0,05 mM-nek kell lennie. E kritériumok teljesülésének hiányában az adatokat el kell vetni, és az adott vizsgálati vegyi anyag esetében a vizsgálatmenetet meg kell ismételni.

Előrejelző modell

A százalékos cisztein- és lizinkiürülés átlagát minden egyes vegyi anyagnál ki kell számítani. A negatív kiürülés „0”-nak tekintendő az átlag kiszámítása során. Az 1. táblázatban szemléltetett, 1:10 arányban ciszteint, 1:50 arányban lizint alkalmazó előrejelzési modell alkalmazásával a 6,38 %-os átlagos peptidkiürülési küszöbértéket kell használni a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő megkülönböztetésének alátámasztására. Az előrejelzési modellnek a vizsgálati vegyi anyagok adott reaktivitási osztályba (alacsony, mérsékelt és magas reaktivitás) sorolásához történő alkalmazása talán hasznosnak bizonyulhat egy integrált vizsgálati és értékelési megközelítésen belüli hatáserősség-vizsgálat szempontjából.

▼M7

1. táblázat

1:10 arányban ciszteint, 1:50 arányban lizint alkalmazó előrejelzési modell ([1])

A százalékos cisztein- és lizinkiürülés átlaga	Reaktivitási osztály	DPRA-val végzett előrejelzés ([2])
0 % ≤ %-os kiürülés átlaga ≤ 6,38 %	Reaktivitás hiánya vagy minimális reaktivitás	Negatív
6,38 % < %-os kiürülés átlaga ≤ 22,62 %	Alacsony reaktivitás	Pozitív
22,62 % < %-os kiürülés átlaga ≤ 42,47 %	Mérsékelt reaktivitás	
42,47 % < %-os kiürülés átlaga ≤ 100 %	Magas reaktivitás	

([1]) A számok statisztikailag generált küszöbértékekre vonatkoznak, és nem függnek össze a mérés pontosságával.
([2]) A DPRA-val végzett előrejelzést integrált értékelési és vizsgálati megközelítés keretében, valamint a 9. és 12. pont rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni.

Előfordulhatnak olyan esetek, amikor a vizsgálati vegyi anyag (az anyag, illetve valamely több összetevőből álló anyag vagy keverék egy vagy több összetevője) jelentős mértékben abszorbeálódik 220 nm-en, és retenciós ideje megegyezik a peptidével (koelúció). A vizsgálati vegyi anyag és a peptid elúciós idejének további szétválasztása érdekében a koelúció megoldható a HPLC-beállítás kismértékű kiigazításával. Ha a koelúció megoldására alternatív HPLC-beállítás használatos, a validált beállítással való egyenértékűségét be kell bizonyítani (például a 2. függelékben található jártassági tesztanyagok vizsgálatával). Koelúció bekövetkezésekor a peptid csúcsa nem integrálható és a százalékos peptidkiürülés kiszámítása nem lehetséges. Ha az ilyen vizsgálati vegyi anyagok koelúciója a cisztein- és a lizintartalmú peptidekkel is bekövetkezik, az elemzésről „nem meggyőző”-ként kell beszámolni. Olyan esetekben, ha a koelúció csak a lizintartalmú peptiddel következik be, a 2. táblázatban közölt, 1:10 arányban ciszteint alkalmazó előrejelzési modell alkalmazható.

2. táblázat

1:10 arányban ciszteint alkalmazó előrejelzési modell ([1])

Százalékos ciszteinkiürülés	Reaktivitási osztály	DPRA-val végzett előrejelzés ([2])
0 % ≤ %-os ciszteinkiürülés ≤ 13,89 %	Reaktivitás hiánya vagy minimális reaktivitás	Negatív
13,89 % < %-os ciszteinkiürülés ≤ 23,09 %	Alacsony reaktivitás	Pozitív
23,09 % < %-os ciszteinkiürülés ≤ 98,24 %	Mérsékelt reaktivitás	
98,24 % < %-os ciszteinkiürülés ≤ 100 %	Magas reaktivitás	

([1]) A számok statisztikailag generált küszöbértékekre vonatkoznak, és nem függnek össze a mérés pontosságával.
([2]) A DPRA-val végzett előrejelzést integrált értékelési és vizsgálati megközelítés keretében, valamint a 9. és 12. pont rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni.

Előfordulhatnak egyéb olyan esetek, amikor a vizsgálati vegyi anyag vagy bármelyik peptid retenciós ideje közötti átfedés nem teljes. Ilyen esetekben a százalékos peptidkiürülési értékeket meg lehet becsülni és fel lehet használni az 1:10 arányban ciszteint, illetve az 1:50 arányban lizint alkalmazó előrejelzési modellben, a vizsgálati vegyi anyag reaktivitási osztályba sorolása ugyanakkor nem végezhető el pontosan.

▼M7

A vizsgálati vegyi anyag esetében a cisztein- és a lizintartalmú peptideknél is elegendőnek kell lennie egyetlen HPLC-elemzésnek, ha az eredmény nem egyértelmű. A pozitív és a negatív eredmények megkülönböztetéséhez használt küszöbértékhez közeli eredmények (vagyis határesethez közeli eredmények) esetében további vizsgálatokra lehet szükség. Ha a százalékos kiürülés átlaga az 1:10 arányban ciszteint/1:50 arányban lizint alkalmazó előrejelzési modell esetén 3–10 % közé esik, vagy ha a százalékos ciszteinkiürülés az 1:10 arányban ciszteint alkalmazó előrejelzési modell esetén 9–17 % közé esik, mérlegelni kell egy második vizsgálatmenetet, valamint az első két vizsgálatmenet nem egyező eredményei esetén egy harmadik vizsgálatmenetet.

Vizsgálati jegyzőkönyv

A Vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag

— Egy összetevőből álló anyag:

  — kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók;

  — fizikai megjelenés, vízoldékonyság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

  — tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonossága stb.;

  — vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

  — vizsgált koncentráció(k);

  — tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak.

— Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek:

  — amennyiben lehetséges, az összetevőknek például a kémiai azonosítója (lásd fent), tisztasága, mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai (lásd fent) jellemzik, amennyiben rendelkezésre állnak;

  — fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

  — molekulatömeg vagy látszólagos molekulatömeg ismert összetételű keverékek/polimerek esetén, vagy a vizsgálat lebonyolítása szempontjából releváns egyéb információ;

  — vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

  — vizsgált koncentráció(k);

  — tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak.

Kontrollok

— Pozitív kontroll

  — kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók;

  — fizikai megjelenés, vízoldékonyság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

  — tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonossága stb.;

▼M7

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— adott esetben a pozitív kontrolloknak a vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumoknak való megfelelőségét bizonyító korábbi eredményei.

— Oldószer/Vivőanyag

— az alkalmazott oldószer/vivőanyag és adott esetben az összetevőinek aránya;

— kémiai azonosítás(ok), például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok) és/vagy más azonosítók;

— tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonossága stb.;

— fizikai megjelenés, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben a vizsgálati módszerben említett oldószerektől/vivőanyagoktól eltérő oldószerek/vivőanyagok használatosak, és amennyiben rendelkezésre állnak;

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— az oldószer kiválasztásának indoklása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében;

— az acetonitril esetében a peptid stabilitására kifejtett hatás vizsgálatának eredményei.

A peptidek, a pozitív kontroll és a vizsgálati vegyi anyag előkészítése

— a peptidoldatok jellemzése (a peptid beszállítója, tétele, pontos tömege, a törzsoldathoz adott mennyisége);

— a pozitív kontrollt tartalmazó oldatok jellemzése (a pozitív kontrollanyag pontos tömege, a vizsgálati oldathoz adott mennyisége);

— a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó oldatok jellemzése (a vizsgálati vegyi anyag pontos tömege, a vizsgálati oldathoz adott mennyisége)

A HPLC-műszer beállítása és az azzal végzett elemzés

— a HPLC-műszer, a HPLC- és az előtétoszlopok, a detektor, az automata mintaadagoló típusa;

— a HPLC-elemzés szempontjából releváns paraméterek, például az oszlop hőmérséklete, a befecskendezett térfogat, az áramlási sebesség és a gradiens.

A rendszer alkalmassága

— valamennyi standard és párhuzamos A. referenciakontroll peptid-csúcsterülete 220 nm-en;

— a grafikusan ábrázolt lineáris kalibrációs görbe és a bejelentett r^2;

— az egyes párhuzamos A. referenciakontrollok peptidkoncentrációja;

— a három A. referenciakontroll peptidkoncentrációjának (mM) átlaga, szórása és variációs koefficiense;

— az A. és C. referenciakontrollok peptidkoncentrációja.

▼M7

Elemzéssorozat

— A referenciakontrollok esetében:

  — mindegyik párhuzamos B. és C. referenciakontroll peptid-csúcsterülete 220 nm-en;

  — az acetonitrilben lévő kilenc B. és C. referenciakontroll 220 nm-en számított peptid-csúcsterületének átlaga, szórása és variációs koefficiense (a referenciakontrollok elemzési idő alatti stabilitásához);

  — mindegyik használt oldószer esetében a három megfelelő C. referenciakontroll 220 nm-en számított peptid-csúcsterületének átlaga (a százalékos peptidkiürülés számításához);

  — mindegyik használt oldószer esetében a három megfelelő C. referenciakontroll peptidkoncentrációja (mM);

  — mindegyik használt oldószer esetében a három megfelelő C. referenciakontroll peptidkoncentrációjának (mM) átlaga, szórása és variációs koefficiense.

— A pozitív kontroll esetében:

  — mindegyik párhuzamos kontroll 220 nm-en számított peptid-csúcsterülete;

  — mindegyik párhuzamos kontroll százalékos peptidkiürülése;

  — mindhárom párhuzamos kontroll százalékos peptidkiürülésének átlaga, szórása és variációs koefficiense.

— Minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében:

  — kicsapódás megjelenése a reakciókeverékben az inkubációs idő végén, ha megfigyelték; a kicsapódást újra feloldották-e vagy centrifugálták-e;

  — koelúció jelenléte;

  — adott esetben bármely egyéb releváns észrevétel leírása;

  — mindegyik párhuzamos kontroll 220 nm-en számított peptid-csúcsterülete;

  — mindegyik párhuzamos kontroll százalékos peptidkiürülése;

  — a három párhuzamos kontroll százalékos peptidkiürülésének átlaga, szórása és variációs koefficiense;

  — a százalékos cisztein- és a százalékos lizinkiürülési értékek átlaga;

  — az alkalmazott előrejelzési modell és a DPRA-val végzett előrejelzés.

Jártassági vizsgálat

— Adott esetben a vizsgálati módszer végrehajtásában való laboratóriumi jártasság igazolására alkalmazott eljárás (például jártassági tesztanyagok vizsgálatával) vagy a vizsgálati módszer idővel reprodukálható végrehajtásának igazolására alkalmazott eljárás.

Az eredmények tárgyalása

— a DPRA-val kapott eredmények tárgyalása;

— a vizsgálati módszer eredményeinek integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő tárgyalása, amennyiben rendelkezésre állnak más releváns információk.

Következtetés

▼M7

SZAKIRODALOM

(1) Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Elérhető a következő címen: 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) E melléklet B.6., Bőrszenzibilizáció című fejezete.

(4) E melléklet B.42., Lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer című fejezete

(5) E melléklet B.50., Bőrszenzibilizáció: Lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer (LLNA): DA című fejezete.

(6) E melléklet B.51., Bőrszenzibilizáció: Lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer: BrdU-ELISA című fejezete

(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. Elérhető a következő címen: 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. Accessible at: 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. Elérhető a következő címen: 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. Elérhető a következő címen: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf – 138

(23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

▼M7

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítőképességét mutatja, és relevanciájának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés” szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket (21).

Káros kimeneti út (Adverse Outcome Pathway, AOP): valamely megcélzott vegyi anyag vagy hasonló vegyi anyagok csoportjának kémiai szerkezetéből kiinduló, a molekuláris kiváltó eseményen keresztül az érintett *in vivo* eredményig végbemenő eseménysorozat (2).

Kalibrációs görbe: valamely ismert anyag kísérleti válaszértéke és analitikai koncentrációja közötti összefüggés (más néven: *standard görbe*).

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Variációs koefficiens: a variabilitás mértékegysége, amelyet a párhuzamos adatcsoportok esetében a szórás és az átlag hányadosaként kell kiszámítani. Százalékos arányként történő kifejezéséhez 100-zal megszorozható.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

Integrált vizsgálati és értékelési megközelítés: valamely vegyi anyag vagy vegyianyag-csoport veszélyeinek azonosításához (potenciál), jellemzéséhez (hatáserősség) és/vagy biztonsági értékeléséhez (potenciál, hatáserősség és expozíció) alkalmazott strukturált megközelítés, amely stratégiai szempontból beépít és mérlegel minden olyan releváns adatot, amely hozzájárul a lehetséges veszélyre és/vagy kockázatra és/vagy a további célirányos és ezért minimális vizsgálat szükségességére vonatkozó szabályozói döntéshozatalhoz.

Molekuláris kiváltó esemény: valamely biológiai rendszer vegyi anyag által, molekuláris szinten kiváltott zavara, amely a káros kimeneti útban a kezdőeseményként határozandó meg.

Keverék: két vagy több anyagból álló keverék vagy oldat, amelyben az anyagok nem lépnek egymással reakcióba (1).

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Referenciakontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét az oldószerrel vagy vivőanyaggal együtt tartalmazó nem kezelt minta, amelyet a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt kell feldolgozni az ugyanazon oldószerben feloldott vagy ugyanazon vivőanyaggal felvitt vizsgálati vegyi anyaggal kezelt minták kiindulási értékeinek megállapítása érdekében. Párhuzamos negatív kontrollal elvégzett vizsgálata esetén ez a minta azt is

▼M7

bizonyítja, hogy az oldószer vagy vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (21).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik (21).

Reprodukálhatóság: ugyanazon vegyi anyag ugyanazon vizsgálati protokollal végzett vizsgálata során kapott eredmények egyezése (lásd: megbízhatóság) (21).

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálati módszer helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (21).

Specifikusság: a vizsgálati módszerrel helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (21).

Anyag: természetes állapotban előforduló vagy ipari termelőfolyamatból származó kémiai elemek és azok vegyületei, amelyek a termék stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagokat és az alkalmazott folyamatból származó szennyeződéseket is tartalmazhatnak, de nem tartalmaznak olyan oldószereket, amelyek az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltozása nélkül elkülöníthetők (1).

A rendszer alkalmassága: a műszer teljesítményének (például érzékenységének) az analitikai programcsomag lefuttatása előtt, referenciastandard segítségével végzett elemzésével történő meghatározása (22).

Vizsgálati vegyi anyag: a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezés a vizsgálat tárgyát képező anyagra való hivatkozáshoz használatos.

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

UVCB: Ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

Érvényes vizsgálati módszer: olyan vizsgálati módszer, amely kellően relevánsnak és megbízhatónak minősül egy adott célra, és amely tudományosan megalapozott elveken alapul. Egy-egy vizsgálati módszer abszolút értelemben soha nem érvényes, kizárólag meghatározott céllal összefüggésben az (21).

▼M7

2. függelék

JÁRTASSÁGI TESZTANYAGOK

In chemico bőrszenzibilizáció: közvetlen peptidreaktivitási vizsgálat

E vizsgálati módszer rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak oly módon kell igazolniuk szakmai jártasságukat, hogy az 1. táblázatban javasolt 10 jártassági tesztanyagra vonatkozóan a közvetlen peptidreaktivitási vizsgálattal a várható előrejelzést helyesen állapítják meg, továbbá az egyes peptidek tekintetében a 10 jártassági tesztanyag közül 8 esetében a referenciatartományba eső cisztein- és lizinkiürülési értékeket kapják meg. E jártassági tesztanyagok kiválasztása oly módon történt, hogy a bőrszenzibilizáció veszélye esetén bekövetkező különféle válaszreakciókat képviseljék. További kiválasztási kritérium volt, hogy a jártassági tesztanyagok kereskedelmi forgalomban kaphatóak legyenek, azokra vonatkozóan kiváló minőségű *in vivo* referenciaadatok és a közvetlen peptidreaktivitási vizsgálattal generált, kiváló minőségű *in vitro* adatok álljanak rendelkezésre, és azokat az EURL ECVAM által koordinált validálási vizsgálatban felhasználják a vizsgálati módszernek a vizsgálatban részt vevő laboratóriumokban történő sikeres végrehajtásának bizonyítása érdekében.

1. táblázat

A közvetlen peptidreaktivitási vizsgálatban való szakmai jártasság bizonyításához ajánlott anyagok

Jártassági tesztanyagok	CASRN	Halmazállapot	*In vivo* előrejelzés [1]	DPRA-val végzett előrejelzés [2]	A ciszteintartalmú peptid százalékos kiürülésének tartománya [3]	A lizintartalmú peptid százalékos kiürülésének tartománya [3]
2,4-dinitro-klórbenzol	97-00-7	Szilárd	Szenzibilizáló (szélsőségesen)	Pozitív	90–100	15-45
Oxazolon	15646-46-5	Szilárd	Szenzibilizáló (szélsőségesen)	Pozitív	60–80	10–55
Formaldehid	50-00-0	Folyadék	Szenzibilizáló (erősen)	Pozitív	30–60	0–24
Benzilidén-aceton	122-57-6	Szilárd	Szenzibilizáló (mérsékelten)	Pozitív	80–100	0–7
Farnezal	19317-11-4	Folyadék	Szenzibilizáló (enyhén)	Pozitív	15–55	0-25
2,3-butándion	431-03-8	Folyadék	Szenzibilizáló (enyhén)	Pozitív	60–100	10–45
1-butanol	71-36-3	Folyadék	Nem szenzibilizáló	Negatív	0–7	0–5,5
6-metil-kumarin	92-48-8	Szilárd	Nem szenzibilizáló	Negatív	0–7	0–5,5
Tejsav	50-21-5	Folyadék	Nem szenzibilizáló	Negatív	0–7	0–5,5
4-metoxi-acetofenon	100-06-1	Szilárd	Nem szenzibilizáló	Negatív	0–7	0–5,5

[1] Az *in vivo* veszélyekre és (a hatáserősségre vonatkozó) előrejelzések LLNA-adatokon alapulnak (19). Az *in vivo* hatáserősség levezetése az ECETOC által javasolt kritériumok segítségével történik (23).

[2] A DPRA-val végzett előrejelzést integrált értékelési és vizsgálati megközelítés keretében, valamint a 9. és 11. pont rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni.

[3] 6 független laboratórium által előállított, legalább 10 kiürülési érték alapján meghatározott tartományok.

▼M7

3. függelék

ELEMZÉSSOROZATRA VONATKOZÓ PÉLDÁK

Kalibráló standardok és referenciakontrollok	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Hígítópuffer A. referenciakontroll, 1. párhuzamos A. referenciakontroll, 2. párhuzamos A. referenciakontroll, 3. párhuzamos
Koelúciós kontrollok	Az 1. vizsgálati vegyi anyaghoz tartozó 1. koelúciós kontroll Az 2. vizsgálati vegyi anyaghoz tartozó 2. koelúciós kontroll
Referenciakontrollok	B. referenciakontroll, 1. párhuzamos B. referenciakontroll, 2. párhuzamos B. referenciakontroll, 3. párhuzamos
Párhuzamosok első sorozata	C. referenciakontroll, 1. párhuzamos Fahéjaldehid, 1. párhuzamos 1. minta, 1. párhuzamos 2. minta, 1. párhuzamos
Párhuzamosok második sorozata	C. referenciakontroll, 2. párhuzamos Fahéjaldehid, 2. párhuzamos 1. minta, 2. párhuzamos 2. minta, 2. párhuzamos
Párhuzamosok harmadik sorozata	C. referenciakontroll, 3. párhuzamos Fahéjaldehid, 3. párhuzamos 1. minta, 3. párhuzamos 2. minta, 3. párhuzamos
Referenciakontrollok	B. referenciakontroll, 4. párhuzamos B. referenciakontroll, 5. párhuzamos B. referenciakontroll, 6. párhuzamos

Három referenciakontroll-sorozatot (azaz mindössze a megfelelő oldószerben feloldott peptidből álló mintákat) kell az elemzéssorozatban alkalmazni:
A. referenciakontroll: a HPLC-rendszer alkalmasságának ellenőrzésére használatos.
B. referenciakontroll: az elemzéssorozat elején és végén alkalmazzák a referenciakontrollok elemzési idő alatti stabilitásának ellenőrzéséhez.
C. referenciakontroll: annak ellenőrzése érdekében alkalmazzák az elemzéssorozatban, hogy a vizsgálati vegyi anyag feloldására használt oldószer nem befolyásolja-e a százalékos peptidkiürülést.

▼M7

B.60. *IN VITRO* BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: ARE-NRF2 LUCIFERÁZ ALAPÚ VIZSGÁLATI MÓDSZER

BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 442D. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A bőrszenzibilizáló anyag a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS) (1) és az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendelet ([1]) (CLP-rendelet) szerint olyan anyag, amely a bőrrel való érintkezést követően allergiás reakciót vált ki. Ez a vizsgálati módszer olyan *in vitro* eljárást (ARE-Nrf2 luciferáz alapú vizsgálat) tesz lehetővé, amellyel támogatható a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetése az ENSZ-GHS-nek (1) és a CLP-rendeletnek megfelelően.

A bőrszenzibilizációt előidéző főbb biológiai eseményeket illetően általános egyetértés van. A bőrszenzibilizációhoz kapcsolódó kémiai és biológiai mechanizmusokról már rendelkezésre álló ismereteket úgynevezett káros kimeneti út (Adverse Outcome Pathway, AOP) (2) foglalja össze a molekuláris kiváltó eseménytől a köztes eseményeken át a káros hatásig, amely embereknél allergiás kontakt bőrgyulladás, rágcsálóknál pedig kontakt túlérzékenység (2) (3). A molekuláris kiváltó esemény az elektrofil anyagok és a bőrben lévő fehérjék nukleofil centrumai között létrejövő kovalens kötés. E káros kimeneti úton a második kulcsfontosságú esemény a keratinsejtekben következik be, többek között gyulladást okozó reakciók, valamint konkrét sejtjelző útvonalakhoz, például az antioxidáns/elektrofil válaszelemtől (ARE) függő útvonalakhoz kapcsolódó génexpresszió formájában. A harmadik kulcsfontosságú esemény a dendritikus sejtek aktivációja, melynek értékelése jellemzően konkrét sejtfelületi markerek, kemokinek és citokinek expressziója alapján történik. A negyedik kulcsfontosságú esemény a T-sejtek proliferációja, melynek közvetett értékelése az egereken alkalmazott lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer (4) keretében történik.

A bőrszenzibilizáció vizsgálata jellemzően kísérleti állatokon történő vizsgálatot foglal magában. A tengerimalacokon alkalmazott klasszikus módszerek, vagyis a Magnusson–Kligman-féle tengerimalac-maximizációs vizsgálat és a Bühler-féle vizsgálat (B.6. vizsgálati módszer (5)) egyaránt a bőrszenzibilizáció indukciós és kiváltási fázisával foglalkozik. Az egereken alkalmazott lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer (LLNA, B.42. vizsgálati módszer (4)) és két nem radioaktív változata, az LLNA: DA (B.50. vizsgálati módszer (6)) és az LLNA: BrdU-ELISA (B.51. vizsgálati módszer (7)), amely mind csak az indukciós reakciót vizsgálja, szintén elfogadottá vált, mivel állatjólét szempontjából előnyösebbek, mint a tengerimalacon végzett vizsgálatok, és objektív mérést tesznek lehetővé a bőrszenzibilizáció indukciós fázisában.

Újabban a mechanisztikus alapú *in chemico* és *in vitro* vizsgálati módszerek a vegyi anyagok bőrszenzibilizációs veszélyének értékelése szempontjából tudományosan megalapozottnak tekinthetőek. Szükség lesz azonban nem állatokon alkalmazott módszerek (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) integrált vizsgálati és értékelési megközelítésen belüli kombinációira a jelenleg alkalmazott állatkísérletek teljes felváltásához, mivel a jelenleg rendelkezésre álló, nem állatokon alkalmazott vizsgálati módszerekre a káros kimeneti út mechanisztikus szempontjai csak korlátozott mértékben terjednek ki (2) (3).

Ez a vizsgálati módszer (ARE-Nrf2 luciferáz alapú vizsgálat) a 2. pontban kifejtett második kulcsfontosságú esemény tárgyalására javasolt. Beszámolók szerint a bőrszenzibilizáló anyagok antioxidáns válaszelemmel (ARE) szabályozott géneket idéznek elő (8) (9). A bőrszenzibilizáló anyagokhoz hasonló, kisméretű

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 2008. december 16-i 1272/2008/EK rendelete az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353., 2008.12.31., 1. o.).

▼M7

elektrofil anyagok kifejthetnek hatást a Keap1 szenzorfehérjére (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) például cisztein-maradékának kovalens módosításával, ami az Nrf2 transzkripciós faktortól (nukleáris faktor-eritroid 2-kapcsolt faktor 2) való különválását eredményezi. A disszociált Nrf2 ezt követően aktiválhat ARE-függő géneket, például a II. fázisban ható detoxifikáló enzimeket kódoló géneket (8) (10) (11).

Jelenleg az e vizsgálati módszer keretébe tartozó *in vitro* ARE-Nrf2 luciferáz alapú vizsgálat csak a KeratinoSens™ vizsgálat, amelyre vonatkozóan validálási vizsgálatokat bonyolítottak (9) (12) (13), és azokat az állatkísérletek alternatív módszereinek uniós referencialaboratóriuma (EURL ECVAM) által végzett független szakértői értékelés (14) követte. A KeratinoSens™ vizsgálat egy integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő alkalmazásra, a veszélyességi osztályozás és címkézés céljából a bőrszenzibilizáló és nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására tudományosan megalapozottnak minősült (14). A vizsgálati módszert bevezetni kívánó laboratóriumok a KeratinoSens™ vizsgálat során használt rekombináns sejtvonalat a vizsgálati módszer kifejlesztőjével kötött licenciamegállapodással szerezhetik meg (15).

A fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK, ALKALMAZHATÓSÁG ÉS KORLÁTOK

Mivel a Keap1-Nrf2-ARE útvonal aktiválása a bőrszenzibilizációs káros kimeneti útnak csak a második kulcsfontosságú eseményét érinti, nem valószínű, hogy a vizsgálati módszerekből származó, ezen útvonal aktiválásán alapuló információk önmagukban elegendőek a vegyi anyagok bőrszenzibilizáló hatásának megállapításához. Ezért az e vizsgálati módszerrel kapott adatokat integrált megközelítés, például integrált vizsgálati és értékelési megközelítés összefüggésében kell mérlegelni olyan egyéb, kiegészítő információkkal együtt, mint a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út más kulcsfontosságú eseményeivel foglalkozó *in vitro* vizsgálatok eredményei, valamint a vizsgálat nélküli módszerekkel, köztük a kémiai analógokból kereszthivatkozással kapott adatok. Az ARE-Nrf2 luciferáz alapú vizsgálati módszer alkalmazására vonatkozó példák egyéb információkkal együtt a szakirodalomban szerepelnek (13) (16) (17) (18) (19).

Ez a vizsgálati módszer az integrált vizsgálati és értékelési megközelítéssel összefüggésben felhasználható a bőrszenzibilizáló (vagyis az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének támogatására. Ez a vizsgálati módszer nem alkalmazható önmagában sem a bőrszenzibilizáló anyagoknak az ENSZ-GHS-ben/a CLP-rendeletben meghatározott 1A. és 1B. alkategóriába sorolására, sem a hatáserősség előrejelzésére a biztonsági értékeléssel kapcsolatos döntések esetén. A szabályozási kerettől függően azonban a pozitív eredmények önmagukban is felhasználhatók a vegyi anyagok ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába sorolására.

A validálási vizsgálat adatkészlete és a vizsgálati módszer független szakértői értékeléséhez használt házon belüli vizsgálatok alapján a KeratinoSens™ vizsgálatról bebizonyosodott, hogy áthelyezhető a sejttenyésztés területén tapasztalattal rendelkező laboratóriumokba. A vizsgálati módszertől várható előrejelzések reprodukálhatóságának mértéke a laboratóriumokon belül és között mintegy 85 % (14). A KeratinoSens™ vizsgálatnak a bőrszenzibilizáló (azaz az ENSZ-GHS/a CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) anyagok nem szenzibilizáló anyagoktól való megkülönböztetése tekintetében érvényes, az LLNA vizsgálati módszer eredményéhez viszonyított pontossága, (77 % – 155/201), érzékenysége (78 % – 71/91) és specifikussága (76 % – 84/110) a vizsgálati módszer értékelése és szakértői értékelése céljából az EURL ECVAM-hoz benyújtott összes adat figyelembevételével került kiszámításra (14). Ezek a számadatok hasonlóak a mintegy 145 anyag (77 %-os pontosság, 79 %-os érzékenység, 72 %-os specifikusság) házon belüli vizsgálata alapján nemrég közzétett számadatokhoz (13). A KeratinoSens™ vizsgálat nagyobb valószínűséggel jelez előre alacsonyabb értékeket olyan vegyi anyagoknál, amelyeknek alacsonytól mérsékeltig terjedő a

▼M7

szenzibilizáló hatása (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1B. alkategóriába tartozó anyagoknál), mint a rendkívül bőrszenzibilizáló hatást mutató vegyi anyagoknál (azaz az ENSZ-GHS/a CLP-rendelet szerinti 1A. alkategóriába tartozó anyagoknál) (13) (14). Ezek az információk összességében azt jelzik, hogy a KeratinoSens™ vizsgálat érdemben hozzájárul a bőrszenzibilizáció veszélyének azonosításához. A KeratinoSens™ vizsgálat mint önálló vizsgálati módszer esetében itt megadott pontossági értékek azonban csak irányadóak, ugyanis a vizsgálati módszert az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében más információforrásokkal együtt és a fenti 9. pont rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni. Ezen túlmenően a bőrszenzibilizáció nem állatokon alkalmazott módszereinek értékelésekor nem szabad megfeledkezni arról, hogy az LLNA vizsgálat, valamint más állatkísérletek nem feltétlenül tükrözik teljes egészében az érintett fajnál, például az embernél fennálló helyzetet.

E vizsgálati módszer esetében a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezés a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra vonatkozik, nem az ARE-Nrf2 luciferáz alapú vizsgálat anyagok és/vagy keverékek vizsgálatára való alkalmazhatóságához kapcsolódik. A jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján a KeratinoSens™ vizsgálatról bebizonyosodott, hogy különféle szerves funkciós csoportokat, reakciómechanizmusokat, (*in vivo* vizsgálatok során meghatározott) bőrszenzibilizáló hatásokat és fizikai-kémiai tulajdonságokat képviselő vizsgálati vegyi anyagokra alkalmazandó (9) (12) (13) (14). Elsősorban egy összetevőből álló anyagok vizsgálatára került sor, bár a keverékek vizsgálatára vonatkozóan is rendelkezésre áll korlátozott mennyiségű információ (20). A vizsgálati módszer mindazonáltal a több összetevőből álló anyagok és keverékek vizsgálatára technikailag alkalmazható. E vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt azonban meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény. Ezenfelül a több összetevőből álló anyagok vagy keverékek vizsgálata során figyelembe kell venni a citotoxikus összetevőknek a megfigyelt válaszreakciókkal való lehetséges kölcsönhatását. A vizsgálati módszer olyan vizsgálati vegyi anyagokra alkalmazandó, amelyek a vízben vagy dimetil-szulfoxidban oldhatók vagy azokkal stabil diszperziót (azaz olyan kolloidot vagy szuszpenziót, amelyben a vizsgálati vegyi anyag nem ülepedik le, illetve nem válik szét az oldószertől különböző fázisokra) alkotnak (több összetevőből álló anyag vagy keverék vizsgálata esetén ez a vizsgálati vegyi anyag összes összetevőjére igaz). Azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek a legmagasabb előírt végleges koncentrációnál (2 000 μM) nem teljesítik ezeket a feltételeket (lásd a 22. pontot), alacsonyabb koncentrációknál továbbra is vizsgálhatók. Ilyen esetben a pozitivitás 39. pontban ismertetett kritériumainak megfelelő eredmények továbbra is felhasználhatók a vizsgálati vegyi anyag bőrszenzibilizálóként történő azonosítására, míg az 1 000 μM koncentrációnál alacsonyabb koncentrációk alkalmazásával kapott negatív eredmény nem meggyőzőnek tekintendő (lásd a 39. pontban lévő előrejelzési modellt). Az 5-nél nem magasabb LogP értékű anyagok vizsgálata általában sikeres, míg a 7-nél magasabb LogP értékű, rendkívül hidrofób anyagok a vizsgálati módszert ismert alkalmazhatóságán kívül esnek (14). Az 5 és 7 közötti LogP értékű anyagokra vonatkozóan csak kevés információ áll rendelkezésre.

A negatív eredményeket óvatosan kell értelmezni, mivel a kizárólagosan a lizinmaradékok felé reaktivitást mutató anyagokat a vizsgálati módszer negatívként mutathatja ki. Ezen túlmenően az alkalmazott sejtvonal korlátozott metabolikus képessége (21) és a kísérleti körülmények miatt különösen a lassú oxidációs rátájú pro-haptének (azaz például a P450 enzim közreműködésével enzimatikus aktivációt igénylő vegyi anyagok) és pre-haptének (azaz az automatikus oxidációval aktiválódó vegyi anyagok) is adhatnak negatív eredményeket. Másrészt a nem szenzibilizálóként ható, de ennek ellenére kémiai stresszorként fellépő vizsgálati vegyi anyagok hamis pozitív eredményekhez vezetnek (14). Ezenfelül a rendkívül citotoxikus vizsgálati vegyi anyagok nem mindig értékelhetők megbízhatóan. Végezetül a luciferáz enzimmel kölcsönhatásba lépő vizsgálati vegyi anyagok megzavarhatják a luciferáz hatását a sejtes tesztekben, látszólagos gátlást vagy megnövekedett lumineszcenciát okozva (22). Beszámoltak például arról, hogy az 1 μM-nél magasabb fitoösztrogén-koncentráció a luciferáz riportergén

▼M7

túlzott aktiválása miatt zavarja a lumineszcencia jeleit más, luciferáz alapú riportergén-vizsgálatokban (23). Következésképp a magas fitoösztrogén-koncentráció mellett vagy feltehetőleg a luciferáz riportergént a fitoösztrogénhez hasonlóan túlzottan aktiváló hasonló vegyi anyagok magas koncentrációja mellett kapott luciferáz-expressziót körültekintően meg kell vizsgálni (23). Olyan esetekben, ha bizonyítékkal igazolható, hogy a vizsgálati módszer nem alkalmazható más, konkrét vegyianyag-kategóriákra, a vizsgálati módszert nem szabad e vegyianyag-kategóriákra alkalmazni.

A KeratinoSens™ vizsgálat – amellett, hogy alátámasztja a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok közötti különbségtételt – olyan koncentráció-válasz információval is szolgál, amely hozzájárulhat a szenzibilizáló hatáserősség értékeléséhez is, ha az integrált értékelési és vizsgálati megközelítéshez hasonló integrált megközelítés keretében használják (19). Szükség van azonban további, lehetőleg megbízható humán adatokon alapuló kutatásra annak meghatározása érdekében, hogy a KeratinoSens™ vizsgálat eredményei hogyan járulnak hozzá a hatáserősség értékeléséhez (24) és a szenzibilizáló anyagoknak az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti alkategóriákba sorolásához.

A VIZSGÁLAT ELVE

Az ARE-Nrf2 luciferáz alapú vizsgálati módszer a szelektálható plazmiddal stabilan transzfektált HaCaT emberi keratinocitákból származó immortalizált adherens sejtvonalakat használ. A sejtvonal az azt alkotó promóter, valamint a bőrszenzibilizáló anyagokkal közismerten felülszabályozott génből származó antioxidáns válaszelem fúziójának transzkripciós szabályozása mellett tartalmazza a luciferáz gént (25) (26). A luciferáz jel az endogén Nrf2-függő gének szenzibilizáló anyagokkal való aktiválását tükrözi, és a rekombináns sejtvonalon belüli luciferáz jelnek az Nrf2 transzkripciós faktortól való függősége bizonyítást nyert (27). Ez lehetővé teszi a luciferázgén-indukció (lumineszcencia-detektálással történő) kvantitatív mérését, mégpedig az Nfr2 transzkripciós faktor elektrofil anyagoknak való expozíciót követő, sejteken belüli aktivitásának mutatójaként jól bevált fénytermelő luciferáz szubsztrátok segítségével.

A KeratinoSens™ vizsgálatban a vizsgálati vegyi anyagok akkor minősülnek pozitívnak, ha egy adott küszöbérték felett a luciferáz-aktivitás statisztikailag szignifikáns (azaz 1,5-szeresnél nagyobb vagy 50 %-os) indukcióját idézik elő egy olyan meghatározott koncentráció alatt, amely nem befolyásolja jelentősen a sejtéletképességet (azaz 1 000 μM alatti és olyan koncentráció mellett, amelynél a sejtéletképesség 70 % feletti (9) (12)). E célból az oldószeres (negatív) kontrollal szembeni luciferáz-aktivitás valahányszoros indukciójának maximális értékét (I_{max}) meg kell határozni. Ezen túlmenően, mivel a sejteket a vizsgálati vegyi anyag több koncentrációjának kell kitenni, a luciferáz-aktivitás küszöbérték (azaz $EC_{1,5}$ érték) feletti, statisztikailag szignifikáns indukciójához szükséges koncentrációt a dózis-válasz görbéből kell interpolálni (a számításokért lásd a 32. pontot). Végezetül citotoxicitás-méréseket kell végezni annak értékeléséhez, hogy a luciferáz-aktivitás indukciójának szintje a citotoxikus koncentrációknál alacsonyabb koncentráció mellett bekövetkezik-e.

Az e vizsgálati módszerhez kapcsolódó, ARE-Nrf2 luciferáz alapú vizsgálat rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak a 2. függelékben felsorolt tíz jártassági tesztanyag felhasználásával kell igazolniuk szakmai jártasságukat.

A KeratinoSens™ vizsgálathoz hasonló ARE-Nrf2 luciferáz alapú, új vagy módosított *in vitro* vizsgálati módszerek validálásának megkönnyítéséhez rendelkezésre állnak teljesítményszabványok (28), amelyek lehetővé teszik e vizsgálati iránymutatás időben történő módosítását az új módszerek e vizsgálati iránymutatásba való beépítéséhez. Az adatok OECD-megállapodás szerinti kölcsönös elfogadása csak a teljesítményszabványoknak megfelelően validált vizsgálati módszerek esetében lesz garantált, ha e vizsgálati módszereket az OECD felülvizsgálta és belefoglalta a megfelelő vizsgálati iránymutatásba.

▼M7

ELJÁRÁS

Az e vizsgálati iránymutatás keretébe tartozó egyetlen módszer jelenleg a tudományosan megalapozott KeratinoSens™ vizsgálat (9) (12) (13) (14). A KeratinoSens™ vizsgálathoz rendelkezésre állnak a standard műveleti eljárások, amelyeket alkalmazni kell e vizsgálati módszer laboratóriumi végrehajtása és igénybevétele során (15). A vizsgálati módszert bevezetni kívánó laboratóriumok a KeratinoSens™ vizsgálat során használt rekombináns sejtvonalat a vizsgálati módszer kifejlesztőjével kötött licenciamegállapodással szerezhetik meg. A következő pontok ismertetik az ARE-Nrf2 luciferáz alapú vizsgálati módszer főbb összetevőit és eljárásait.

A keratinocita-tenyészetek előkészítése

A luciferáz riportergént az ARE-elem szabályozása mellett stabilan beillesztő transzgénikus sejtvonalat kell használni (például a KeratinoSens™ sejtvonalat). A sejteket a beérkezésüket követően (például 2–4 passzálással) szaporítani kell, és homogén állományként fagyasztva kell tárolni. Az ebből az eredeti állományból származó sejtek maximális számú passzálással szaporíthatók (ez a KeratinoSens™ esetében 25), és megfelelő fenntartó közeg használatával (a KeratinoSens™ esetében ez szérumot és Geneticint tartalmazó DMEM) rutinszerű vizsgálat céljára alkalmazhatók.

A sejteknek a vizsgálathoz 80–90 %-ban konfluensnek kell lenniük, és ügyelni kell annak biztosítására, hogy a sejtek soha ne növekedjenek a teljes konfluencia eléréséig. A vizsgálat előtt egy nappal a sejteket be kell gyűjteni, és azokat 96-lyukú lemezeken szét kell oszlatni (a KeratinoSens™ esetében lyukanként 10 000 sejt lehet). Annak biztosítása érdekében, hogy az egyes lyukak között homogén legyen a sejtszám eloszlása, ügyelni kell annak elkerülésére, hogy a leoltás alatt a sejtek leülepedjenek. Eltérő esetben e lépés következtében nagymértékű lehet a lyukankénti variabilitás. Minden megismételt kísérlet esetében a luciferáz-aktivitás méréséhez három párhuzamost, a sejtéletképesség-vizsgálathoz pedig egy párhuzamost kell alkalmazni.

A vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok előkészítése

A vizsgálati vegyi anyagot és a kontrollanyagokat a vizsgálat napján kell előkészíteni. A KeratinoSens™ vizsgálathoz a vizsgálati vegyi anyagokat dimetil-szulfoxidban (DMSO) kell a kívánt végső koncentrációra (például 200 mM) feloldani. A DMSO-oldatok önsterilizálónak tekinthetők, ezért csíramentesítő szűrésre nincs szükség. A DMSO-ban nem oldható vizsgálati vegyi anyagot csíramentes vízben vagy tenyészközegben kell feloldani, és az oldatokat például szűréssel kell csíramentesíteni. A meghatározott molekulatömeggel nem rendelkező vizsgálati vegyi anyaghoz a KeratinoSens™ vizsgálatban alapértelmezett koncentrációjú (40 mg/mL vagy 4 vegyesszázalékos) törzsoldatot kell készíteni. A DMSO-tól, a víztől vagy a tenyészközegtől eltérő oldószerek használata esetén kellő mértékű tudományos indokolást kell adni.

A vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó DMSO-törzsoldatok alapján a vizsgálandó vegyi anyag 12 (a KeratinoSens™ vizsgálatban 0,098 mM és 200 mM közötti) törzskoncentrációjának előállításához DMSO-val kell oldatsorozatot készíteni. A DMSO-ban nem oldható vizsgálati vegyi anyagok esetében a törzskoncentráció előállításához szükséges hígításokat csíramentes vízzel vagy csíramentes tenyészközeggel kell elvégezni. A használt oldószertől függetlenül a törzskoncentrációkat ezt követően szérumot tartalmazó tenyészközegben 25-szörösükre tovább kell hígítani, végül pedig további 4-szeres hígítási tényezővel kell kezeléshez felhasználni, hogy a vizsgálati vegyi anyag végső koncentrációja a KeratinoSens™ vizsgálatban 0,98 és 2 000 μM közötti tartományba essen. Indokolt esetben más koncentrációk is alkalmazhatók (például citotoxicitás vagy gyenge oldhatóság esetén).

A KeratinoSens™ vizsgálatban alkalmazott negatív (oldószeres) kontroll a DMSO (CAS-szám: 67-68-5, ≥ 99 %-os tisztaság), amelyhez lemezenként hat lyukat kell előkészíteni. Ahhoz, hogy a végső negatív (oldószeres) kontroll koncentrációja 1 % legyen, a 22. pontban a törzskoncentrációkra vonatkozóan leírtakkal megegyező módon kell hígítani; e koncentrációról ismeretes, hogy

▼M7

nem befolyásolja a sejtéletképességet, emellett ugyanazon DMSO-koncentrációnak felel meg, mint a vizsgálati vegyi anyagban és a pozitív kontrollban található DMSO-koncentráció. DMSO-ban nem oldható, vízzel hígított vizsgálati vegyi anyag esetében a DMSO szintjét a végső vizsgálati oldatot tartalmazó összes lyukban 1 %-ra kell kiigazítani, csakúgy, mint a többi vizsgálati vegyi anyag és kontrollanyag esetében.

A KeratinoSens™ vizsgálatban alkalmazott pozitív kontroll a fahéjaldehid (CAS-szám: 14371-10-9, ≥ 98 %-os tisztaság), amelyhez (6,4 mM koncentrációjú törzsoldatból) öt, 0,4–6,4 mM közötti törzskoncentráció-sorozatot kell készíteni DMSO-ban, és a 22. pontban a törzskoncentrációkra vonatkozóan leírtakkal megegyező módon kell hígítani, hogy a pozitív kontroll végső koncentrációja 4–64 μM között legyen. Alkalmazhatók más, megfelelő, lehetőleg középtartományban lévő $EC_{1,5}$ értékeket adó pozitív kontrollok is, ha rendelkezésre állnak történeti adatok hasonló vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumainak származtatásához.

A vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok alkalmazása

Minden egyes vizsgálati vegyi anyag és pozitív kontrollanyag esetében egy kísérletre van szükség a (pozitív vagy negatív) előrejelzéshez, amely kísérlet három-három párhuzamost tartalmazó, legalább két független ismétlésből áll (azaz n=6). A két független ismétlés nem egyező eredményei esetén három párhuzamost tartalmazó harmadik ismétlést kell végezni (azaz n=9). Mindegyik független ismétlést más-más napon, a vizsgálati vegyi anyagot és az egymástól függetlenül begyűjtött sejteket tartalmazó friss törzsoldattal kell elvégezni. A sejtek azonban származhatnak ugyanabból a passzálásból.

A 20. pontban ismertetett leoltást követően a sejteket 24 órán át 96-lyukú mikrotiterlemezeken kell növeszteni. A közeget ezt követően el kell távolítani és friss tenyészközeggel (a KeratinoSens™ vizsgálat esetén 150 μl mennyiségű, szérumot igen, de Geneticint nem tartalmazó tenyészközeggel) kell felváltani, amelyhez a 25-szörös hígítású vizsgálati vegyi anyagból és a kontrollanyagokból 50 μl-t kell adni. A háttérértékek megállapítása érdekében lemezenként legalább egy lyukat üresen (sejt és kezelés nélkül) kell hagyni.

A KeratinoSens™ vizsgálatban a kezelt lemezeket ezt követően kb. 48 óráig 37±1 °C-on 5 % CO_2 jelenlétében inkubálni kell. Ügyelni kell az illékony vizsgálati vegyi anyagok elpárolgásának elkerülésére, valamint a lyukak vizsgálati vegyi anyagokkal való keresztszennyeződésének elkerülésére, például a lemezek vizsgálati vegyi anyagokkal való inkubálás előtt fóliával való befedésével.

A luciferáz-aktivitás mérése

A megfelelő lumineszcencia-leolvasások biztosításához három tényező kulcsfontosságú:

— érzékeny luminométer választása,

— a fény-keresztszennyeződés elkerülése érdekében kellő magasságú lemezformátum használata, valamint

— a kellő szenzitivitás és az alacsony variabilitás biztosításához kellő fénykimenetű luciferáz szubsztrát használata.

E három tényező teljesülésének biztosítása érdekében a vizsgálat előtt a 3. függelékben ismertetett beállítással kontrollkísérletet kell végezni.

A KeratinoSens™ vizsgálatban a vizsgálati vegyi anyaggal és a kontrollanyagokkal alkalmazott 48 órás expozíciós idő elteltével a sejteket foszfáttal pufferolt sóoldattal kell átmosni, és a lumineszcencia-leolvasásokhoz tartozó megfelelő lízispuffert 20 percig szobahőmérsékleten az egyes lyukakba kell adagolni.

▼M7

A sejtlizátumokat tartalmazó lemezeket ezt követően leolvasás céljából a luminométerbe kell helyezni, amelyet a KeratinoSens™ vizsgálatban a következőkre programoznak be: i. a luciferáz szubsztrát hozzáadása az egyes lyukakhoz (például 50 µl), ii. 1 másodperces várakozás, és iii. a luciferáz-aktivitás integrálása 2 másodpercig. Alternatív beállítások használata esetén, például az alkalmazott luminométer-modelltől függően ezeket meg kell indokolni. Ezenfelül fénylő szubsztrát is alkalmazható azzal a feltétellel, hogy a 3. függelék szerinti minőség-ellenőrzési kísérlet teljesül.

Citotoxicitás-vizsgálat

A KeratinoSens™ sejtéletképesség-vizsgálathoz a közeget a 48 órás expozíciós idő elteltével az MTT-t (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5- difenil-tetrazólium-bromid, Tiazolil kék tetrazólium-bromid; CAS-szám: 298-93-1) tartalmazó friss közeggel kell felváltani, és a sejteket 4 órán keresztül 37 °C-on 5 % CO_2 jelenlétében inkubálni kell. Az MTT-közeget ezt követően el kell távolítani és a sejteket egy éjszakán át lizálni kell (például az egyes lyukakba adagolt 10 %-os SDS-oldattal). A felrázás után az abszorpciót például 600 nm-en meg kell mérni fotométerrel.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az adatok kiértékelése

A KeratinoSens™ vizsgálatban az alábbi paramétereket kell kiszámítani:

— a luciferáz-aktivitás valahányszoros indukciójának a vizsgálati vegyi anyag és a pozitív kontrollanyag bármely koncentrációjánál megfigyelt legmagasabb átlagértéke (I_{max});

— az $EC_{1,5}$ érték, azaz az a koncentráció, amelynél a luciferáz-aktivitás 1,5-szeres küszöbértéket meghaladó indukciója (azaz az 50 %-kal erősebb luciferáz-aktivitás) létrejött; valamint

— a sejtéletképesség 50 %-os, illetve 30 %-os csökkenésének megfelelő IC_{50} illetve IC_{30} koncentráció-értékek.

— A luciferáz-aktivitás valahányszoros indukcióját az 1. egyenlettel, az általában legmagasabb valahányszoros indukciót (I_{max}) pedig az egyes megismételt kísérletek átlagaként kell kiszámítani:

1. egyenlet:

$$Valahányszoros\ indukció = \frac{(L_{minta} - L_{vakpróba})}{(L_{oldószer} - L_{vakpróba})}$$

ahol:

L_{minta} a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó lyukban leolvasott lumineszcencia-érték

$L_{vakpróba}$ a sejtek és kezelés nélküli vakpróbalyukban leolvasott lumineszcencia-érték

$L_{oldószer}$ a sejteket és az oldószeres (negatív) kontrollt tartalmazó lyukakban leolvasott átlagos lumineszcencia-érték

Az $EC_{1,5}$ értéket a 2. egyenlet szerinti lineáris interpolációval, az általános $EC_{1,5}$ értéket pedig az egyes ismétlések mértani középértékeként kell kiszámítani.

2. egyenlet:

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

ahol:

C_a a μM-ben kifejezett legalacsonyabb koncentráció 1,5-szeres indukciónál magasabb indukció mellett

C_b a μM-ben kifejezett legmagasabb koncentráció 1,5-szeres indukciónál alacsonyabb indukció mellett

I_a a 1,5-szeres indukciónál magasabb indukció melletti legalacsonyabb koncentrációnál mért valahányszoros indukció (három párhuzamos lyuk átlaga)

I_b a 1,5-szeres indukciónál alacsonyabb indukció melletti legmagasabb koncentrációnál mért valahányszoros indukció (három párhuzamos lyuk átlaga)

Az életképességet a 3. egyenlettel kell kiszámítani:

3. egyenlet:

$$\textit{Életképesség} = \frac{(V_{minta} - V_{vakpróba})}{V_{oldószer} - V_{vakpróba}} \times 100$$

ahol:

V_{minta} a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó lyukban leolvasott MTT-abszorbanciaérték

$V_{vakpróba}$ a sejtek és kezelés nélküli vakpróbalyukban leolvasott MTT-abszorbanciaérték

$V_{oldószer}$ a sejteket és az oldószeres (negatív) kontrollt tartalmazó lyukakban leolvasott átlagos MTT-abszorbanciaérték

Az IC_{50} és az IC_{30} értéket a 4. egyenlet szerinti lineáris interpolációval, az általános IC_{50} és IC_{30} értéket pedig az egyes ismétlések mértani középértékeként kell kiszámítani.

4. egyenlet:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

ahol:

X a kiszámítandó %-os csökkenés az adott koncentrációnál (50, illetve 30 az IC_{50} és az IC_{30} esetén)

C_a a μM-ben kifejezett legalacsonyabb koncentráció x %-ot meghaladó életképesség-csökkenés mellett

C_b a μM-ben kifejezett legmagasabb koncentráció x %-ot el nem érő életképesség-csökkenés mellett

V_a az x %-ot meghaladó életképesség-csökkenés melletti legalacsonyabb koncentrációnál várható %-os életképesség

V_b az x %-ot el nem érő életképesség-csökkenés melletti legmagasabb koncentrációnál várható %-os életképesség

A 1,5-szeresnél magasabb luciferáz-aktivitás indukciót mutató koncentrációknál oly módon kell kiszámítani a statisztikai szignifikanciát (például kétvégű Student-féle t-próbával), hogy a három párhuzamos minta lumineszcencia-értékeit össze kell vetni az oldószeres (negatív) kontrollként szolgáló lyukakban leolvasott lumineszcencia-értékekkel annak meghatározásához, hogy a luciferáz-aktivitás indukciója statisztikailag szignifikáns-e (p <0 ,05). A 1,5-szeresnél magasabb luciferáz-aktivitás indukció melletti legalacsonyabb koncentráció az $EC_{1,5}$ értéket meghatározó érték. Minden esetben ellenőrizni kell, hogy ez az érték az IC_{30} érték alatt van-e, ami arra utal, hogy az $EC_{1,5}$ értéket meghatározó koncentráció mellett 30 %-nál kisebb mértékű a sejtéletképesség csökkenése.

▼M7

Az adatokat ajánlott szemrevételezéssel ellenőrizni grafikonok segítségével. Ha nem figyelhető meg egyértelmű dózis-válasz görbe, vagy ha a kapott dózis-válasz görbe kétfázisú (azaz kétszer lépi túl a másfélszeres küszöbértéket), a kísérletet meg kell ismételni annak ellenőrzése érdekében, hogy ez a vizsgálati vegyi anyagra jellemző-e vagy kísérleti műhibának tulajdonítható-e. Abban az esetben, ha a kétfázisú válasz független kísérletben reprodukálható, az alacsonyabb $EC_{1,5}$ értéket (a 1,5-szeres küszöbérték első átlépésének időpontjában megfigyelt koncentrációt) kell jelentésbe foglalni.

Azon ritka esetekben, ha 1,5-szeres küszöbérték feletti, statisztikailag nem szignifikáns indukció figyelhető meg, majd statisztikailag szignifikáns indukció magasabb koncentráció mellett, ezen ismétlések eredményei csak akkor minősülnek érvényesnek és pozitívnak, ha a 1,5-szeres küszöbérték feletti statisztikailag nem szignifikáns indukció nem citotoxikus koncentráció esetén következett be.

Végezetül azon vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek már a 0,98 μM legalacsonyabb vizsgálati koncentrációnál 1,5-szeres vagy magasabb indukciót idéznek elő, a 0,98-nál kisebb $EC_{1,5}$ értéket a dózis-válasz görbe szemrevételezéses ellenőrzése alapján kell meghatározni.

Elfogadhatósági kritériumok

A KeratinoSens™ vizsgálat alkalmazásakor az alábbi elfogadhatósági kritériumoknak kell teljesülniük. Először is a pozitív kontrollanyaggal, a fahéjaldehiddel elért luciferáz-aktivitás indukciónak a 1,5-szeres küszöbérték felett statisztikailag szignifikánsnak kell lennie (például t-próba alkalmazásával) legalább a vizsgált koncentrációk egyikében (4-64 μM között).

Másodszor, az $EC_{1,5}$ értéknek a vizsgálatot végző létesítmény történeti átlagát magában foglaló két szórás intervallumában kell lennie (például a validációs adatkészlet alapján 7 μM és 30 μM közötti értéknek), amit rendszeresen frissíteni kell. Ezen túlmenően a fahéjaldehidre vonatkozó három párhuzamosban az átlagos indukciónak 64 μM koncentráció mellett 2 és 8 között kell lennie. Ha az utóbbi kritérium nem teljesül, a fahéjaldehid dózis-válaszát körültekintően kell ellenőrizni, és a vizsgálatok kizárólag akkor elfogadhatóak, ha a luciferáz-aktivitás indukció és a pozitív kontrollanyag koncentrációja együttes növekedése mellett egyértelmű dózis-válasz van.

Végezetül a negatív (oldószeres) DMSO-tartalmú kontroll esetében leolvasott lumineszcencia-értékek átlagos variációs koefficiensének minden ismétlésben (három példányban vizsgált 6 lyukban) 20 %-nál alacsonyabbnak kell lennie. Ha magasabb a variabilitás, az eredményeket el kell vetni.

Az eredmények értelmezése és az előrejelzési modell

A KeratinoSens™ előrejelzés akkor minősül pozitívnak, ha két ismétlésből kettőben vagy három ismétlésből ugyanabban a kettőben mind a négy alábbi feltétel teljesül, egyéb esetben a KeratinoSens™ előrejelzés negatívnak minősül (1. ábra):

1. az I_{max} érték több mint (>) 1,5-szeres és statisztikailag szignifikáns az oldószeres (negatív) kontrollhoz viszonyítva (kétvégű, páratlan, Student-féle t-próbával meghatározott érték);

2. a sejtéletképesség meghaladja a (>) 70 %-ot a 1,5-szerest meghaladó luciferáz-aktivitás indukció melletti legalacsonyabb koncentrációnál (azaz az $EC_{1,5}$ értéket adó koncentrációnál);

3. az $EC_{1,5}$ érték kisebb, mint (<) 1 000 μM (vagy < 200 μg/ml a nem meghatározott MW értékű vizsgálati vegyi anyagok esetében);

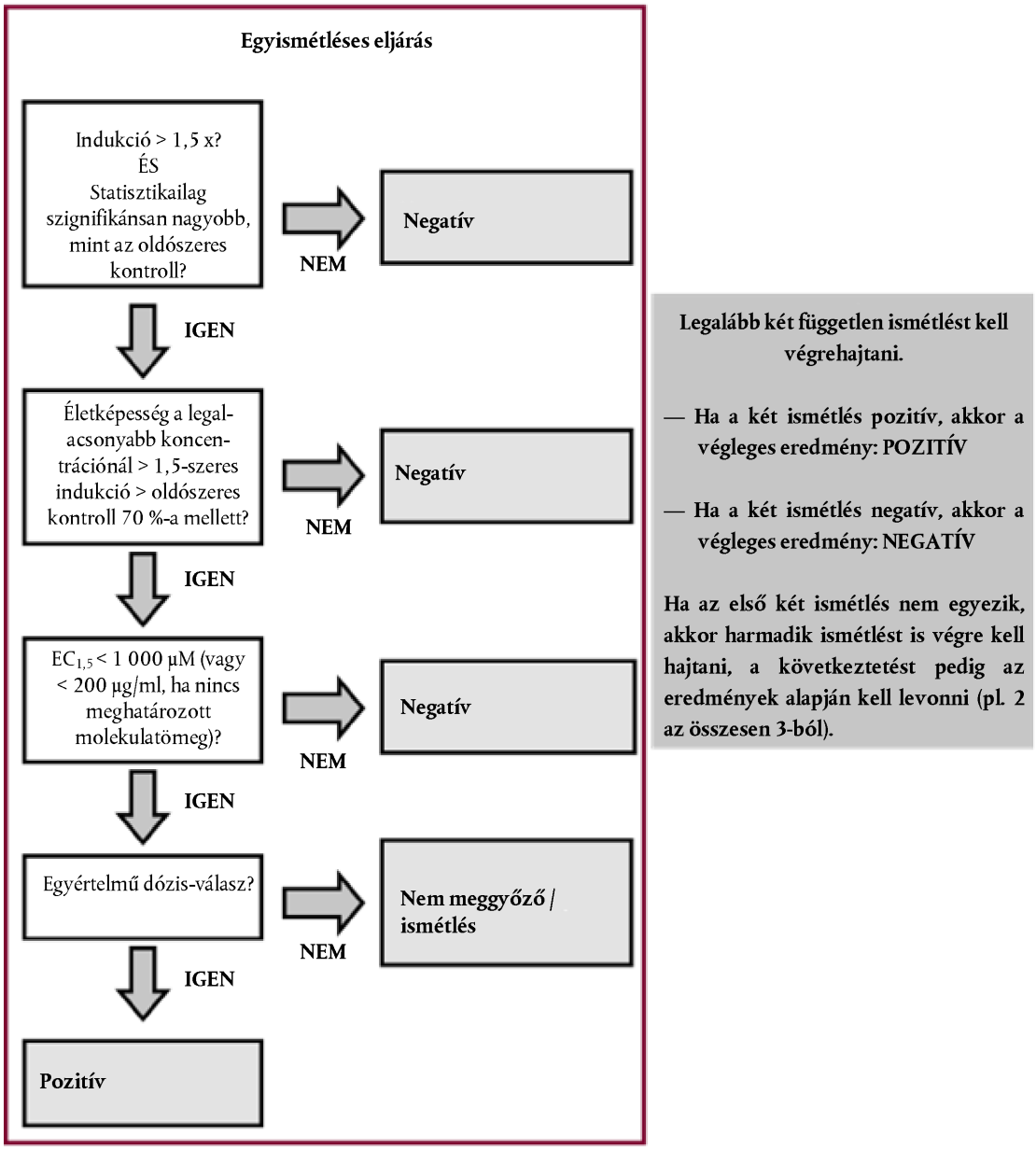
4. látszólag általános dózis-válasz figyelhető meg a luciferáz-indukció esetében (vagy a 33. pontban foglaltak szerinti kétfázisú válasz).

▼M7

Ha egy adott ismétlésen belül az első három feltétel mindegyike teljesül, de nem figyelhető meg egyértelmű dózis-válasz a luciferáz-indukció esetében, akkor ezen ismétlés eredményét nem meggyőzőnek kell tekinteni és további vizsgálatokra lehet szükség (1. ábra). Ezenfelül az 1 000 µM-nál kisebb (vagy a nem meghatározott MW értékű vizsgálati vegyi anyagok esetében 200 µg/ml-nél kisebb) koncentráció mellett kapott negatív eredményt szintén nem meggyőzőnek kell tekinteni (lásd a 11. pontot).

1. ábra

A KeratinoSens™ vizsgálatban alkalmazott előrejelzési modell. A KeratinoSens™ előrejelzést integrált értékelési és vizsgálati megközelítés keretében, valamint a 9. és 11. pont rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni.



Ritka esetekben a citotoxikus szintekhez nagyon közel luciferáz-aktivitást indukáló vizsgálati vegyi anyagok egyes ismétlésekben és nem citotoxikus szinteknél pozitívak lehetnek (azaz az $EC_{1,5}$ értéket meghatározó koncentráció alacsonyabb, mint (<) az IC_{30} érték), más ismétlésekben pedig csak a citotoxikus szinteknél

▼M7

(azaz az $EC_{1,5}$ értéket meghatározó koncentráció magasabb, mint (>) az IC_{30} érték). Az ilyen vizsgálati vegyi anyagokat szűkebb körű dózis-válasz elemzéssel és alacsonyabb hígítási tényezővel (például 1,33-szoros vagy Ö2 (=1,41)-szeres hígítással a lyukak között) újra meg kell vizsgálni annak meghatározásához, hogy az indukció citotoxikus szinten történt-e vagy sem (9).

Vizsgálati jegyzőkönyv

A Vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag

— Egy összetevőből álló anyag:

  — kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók;

  — fizikai megjelenés, vízoldékonyság, DMSO-ban való oldhatóság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

  — tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonossága stb.;

  — vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

  — vizsgált koncentráció(k);

  — tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak.

— Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek:

  — amennyiben lehetséges, az összetevőknek például a kémiai azonosítója (lásd fent), tisztasága, mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai (lásd fent) jellemzik, amennyiben rendelkezésre állnak;

  — fizikai megjelenés, vízoldékonyság, DMSO-ban való oldhatóság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

  — molekulatömeg vagy látszólagos molekulatömeg ismert összetételű keverékek/polimerek esetén, vagy a vizsgálat lebonyolítása szempontjából releváns egyéb információ;

  — vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

  — vizsgált koncentráció(k);

  — tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak.

Kontrollok

— Pozitív kontroll:

  — kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók;

  — Fizikai megjelenés, vízoldékonyság, DSMO-ban való oldhatóság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak és szükség szerint;

  — tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonossága stb.;

  — vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

  — vizsgált koncentráció(k);

  — tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

▼M7

— adott esetben a pozitív kontrolloknak a vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumoknak való megfelelőségét bizonyító korábbi eredményei.

— Negatív (vivőanyagos) kontroll:

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok) és/vagy más azonosítók;

— tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonossága stb.;

— fizikai megjelenés, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben a vizsgálati módszerben említett negatív kontrolloktól eltérő negatív kontrollok használatosak, és amennyiben rendelkezésre állnak;

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— az oldószer kiválasztásának indoklása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

A vizsgálati módszer körülményei

— a megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe;

— az alkalmazott vizsgálati módszer leírása;

— használt sejtvonal, tárolási feltételei és eredete (például az a létesítmény, ahonnan azt beszerezték);

— a vizsgálathoz használt sejtek passzálásának száma és konfluenciájának szintje;

— a vizsgálat előtt a leoltáshoz alkalmazott sejtszámlálási módszer és a homogén sejtszám-eloszlás biztosítása érdekében hozott intézkedések (lásd a 20. pontot);

— az alkalmazott luminométer (például modell), beleértve a műszer beállításait, a használt luciferáz szubsztrátot, valamint a megfelelő lumineszcencia-mérések szemléltetése a 3. függelékben ismertetett kontrollvizsgálat alapján;

— a vizsgálati módszer végrehajtásában való laboratóriumi jártasság bizonyítására alkalmazott eljárás (például jártassági tesztanyagok vizsgálatával) vagy a vizsgálati módszer idővel reprodukálható végrehajtásának bizonyítására alkalmazott eljárás.

Vizsgálati eljárás

— az alkalmazott ismétlések és párhuzamosok száma;

— a vizsgálati vegyi anyag koncentrációi, alkalmazási eljárása és az igénybe vett expozíciós idő (ha eltér az ajánlottól);

— az alkalmazott értékelési és döntési kritériumok leírása;

— az alkalmazott vizsgálat-elfogadhatósági kritériumok leírása;

— a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása.

Eredmények

— minden ismétlésben a vizsgálati vegyi anyag és a pozitív kontroll esetében kapott I_{max}, $EC_{1,5}$ értékek és életképességre vonatkozó értékek (azaz az IC_{50}, IC_{30} értékek), valamint átlagok (I_{max}: átlagérték; $EC_{1,5}$ és az életképességre vonatkozó értékek: mértani középérték), továbbá az összes ismétlésből származó adatok felhasználásával kiszámított szórás és a vizsgálati vegyi anyagnak az előrejelzési modell szerinti minősítése;

▼M7

— az egyes kísérleteknél a negatív kontroll esetében leolvasott lumineszcencia-értékekkel kapott variációs koefficiens;

— a luciferáz-aktivitás indukciójára és az életképességre vonatkozó dózis-válasz görbéket ábrázoló grafikon;

— adott esetben bármely más releváns észrevétel leírása.

Az eredmények tárgyalása

— a KeratinoSens™ vizsgálattal kapott eredmények tárgyalása;

— a vizsgálati módszer eredményeinek integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő tárgyalása, amennyiben rendelkezésre állnak más releváns információk.

Következtetés

SZAKIRODALOM

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Elérhető a következő címen: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.

(3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367-485.

(4) E melléklet B.42. fejezete: Bőrszenzibilizáció: Lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer.

(5) E melléklet B.6. fejezete: Bőrszenzibilizáció.

(6) E melléklet B.50. fejezete: Bőrszenzibilizáció: Lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer (LLNA): DA.

(7) E melléklet B.51. fejezete: Bőrszenzibilizáció: Lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer (LLNA): 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. Available at: 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. Elérhető az alábbi címen: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

(16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. Toxicol. Sci. 107, 106-121.

(17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60, 389-400.

(18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. Regul. Toxicol. Pharmacol. 63, 489-504.

(19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J Appl Toxicol. 33, 1353-1364.

(20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology *In Vitro* 27, 1220-1225.

(21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch. Toxicol. 87, 1683-1969.

(22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17, 646-657.

(23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

(25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J. Invest. Dermatol., 126, 1813-1822.

▼**M7**

(26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. Toxicol. Lett. 150, 301-316.

(27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *in vitro* 27, 2225-2232.

(28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N0 213, OECD, Paris.

(29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.

(30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

▼M7

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítőképességét mutatja, és relevanciájának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés” szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket (29).

Káros kimeneti út (Adverse Outcome Pathway, AOP): valamely megcélzott vegyi anyag vagy hasonló vegyi anyagok csoportjának kémiai szerkezetéből kiinduló, a molekuláris kiváltó eseményen keresztül az érintett *in vivo* eredményig végbemenő eseménysorozat (2).

ARE: antioxidáns válaszelem (más néven: EpRE, elektrofil válaszelem), számos citoprotektív és II. fázisú gén felfelé irányuló promóter régiójában megtalálható válaszelem. Ha Nfr2 aktiválja, e gének transzkripciós indukcióját közvetíti.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Variációs koefficiens: a variabilitás mértékegysége, amelyet a párhuzamos adatcsoportok esetében a szórás és az átlag hányadosaként kell kiszámítani. Százalékos arányként történő kifejezéséhez 100-zal megszorozható.

$EC_{1,5}$: 1,5-szeres luciferáz-indukció esetén interpolált koncentráció.

IC_{30}: a sejtéletképesség 30 %-os csökkenését kiváltó koncentráció.

IC_{50}: a sejtéletképesség 50 %-os csökkenését kiváltó koncentráció.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

Integrált vizsgálati és értékelési megközelítés: valamely vegyi anyag vagy vegyianyag-csoport veszélyeinek azonosításához (potenciál), jellemzéséhez (hatáserősség) és/vagy biztonsági értékeléséhez (potenciál, hatáserősség és expozíció) alkalmazott strukturált megközelítés, amely stratégiai szempontból beépít és mérlegel minden olyan releváns adatot, amely hozzájárul a lehetséges veszélyre és/vagy kockázatra és/vagy a további célirányos és ezért minimális vizsgálat szükségességére vonatkozó szabályozói döntéshozatalhoz.

I_{max}: a luciferáz-aktivitásnak az oldószeres (negatív) kontrollhoz viszonyított maximális indukciós tényezője, amelyet a vizsgálati vegyi anyag bármely koncentrációjánál mérnek.

Keap1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*, az Nrf2-aktivitást szabályozó szenzorfehérje. Nem indukált feltételek mellett a Keap1 szenzorfehérje az Nrf2 transzkripciós faktort célozza meg a proteaszóman belüli ubikvitináció és fehérjebomlás céljából. A Keap1 reaktív ciszteinmaradékainak kis molekulákkal végbemenő kovalens módosítása az Nrf2 transzkripciós faktornak a Keap1 szenzorfehérjétől való szétválásához vezethet (8) (10) (11).

▼M7

Keverék: két vagy több anyagból álló keverék vagy oldat, amelyben az anyagok nem lépnek egymással reakcióba (1).

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2, az antioxidáns válaszelem útvonalában érintett transzkripciós faktor. Ha az Nrf2-ben nem megy végbe ubikvitináció, felépíti a citoplazmát és transzlokálódik a sejtmagba, ahol számos citoprotektív gén felfelé tartó promóter régiójában kapcsolódik az ARE válaszelemhez, elindítva e gének transzkripcióját (8) (10) (11).

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (29).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik (29).

Reprodukálhatóság: ugyanazon vegyi anyag ugyanazon vizsgálati protokollal végzett vizsgálata során kapott eredmények egyezése (lásd: megbízhatóság) (29).

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálati módszer helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (29).

Oldószeres/vivőanyagos kontroll: valamely vizsgálati rendszernek a vizsgálati vegyi anyagon kívüli összes összetevőjét tartalmazó párhuzamos, amely azonban magában foglalja az alkalmazott oldószert. Az ugyanabban az oldószerben feloldott vizsgálati vegyi anyaggal kezelt minták esetében a kiindulási érték létrehozásához használatos.

Specifikusság: a vizsgálati módszerrel helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (29).

Anyag: természetes állapotban előforduló vagy ipari termelőfolyamatból származó kémiai elemek és azok vegyületei, amelyek a termék stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagokat és az alkalmazott folyamatból származó szennyeződéseket is tartalmazhatnak, de nem tartalmaznak olyan oldószereket, amelyek az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltozása nélkül elkülöníthetők (1).

Vizsgálati vegyi anyag: a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezés a vizsgálat tárgyát képező anyagra való hivatkozáshoz használatos.

▼M7

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

UVCB: Ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

Érvényes vizsgálati módszer: olyan vizsgálati módszer, amely kellően relevánsnak és megbízhatónak minősül egy adott célra, és amely tudományosan megalapozott elveken alapul. Egy-egy vizsgálati módszer abszolút értelemben soha nem érvényes, kizárólag meghatározott céllal összefüggésben az (29).

▼M7

2. függelék

JÁRTASSÁGI TESZTANYAGOK

In vitro bőrszenzibilizáció: ARE-Nrf2 luciferáz alapú vizsgálati módszer

E vizsgálati módszer rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak igazolniuk kell szakmai jártasságukat oly módon, hogy az 1. táblázatban javasolt 10 jártassági tesztanyagra vonatkozóan a KeratinoSens™ vizsgálattal várható előrejelzést helyesen kapják meg, továbbá a 10 jártassági tesztanyag közül 8 esetében a referenciatartományba eső $EC_{1,5}$ és IC_{50} értékeket kapják meg. E jártassági tesztanyagok kiválasztása oly módon történt, hogy az a bőrszenzibilizáció veszélye esetén bekövetkező különféle válaszreakciók tartományát illetően reprezentatív legyen. További kiválasztási kritérium volt, hogy a jártassági tesztanyagok kereskedelmi forgalomban kaphatóak legyenek, azokra vonatkozóan kiváló minőségű *in vivo* referenciaadatok és a KeratinoSens™ vizsgálatból származó, kiváló minőségű *in vitro* adatok álljanak rendelkezésre.

1. táblázat

A KeratinoSens™ vizsgálatban való szakmai jártasság bizonyításához ajánlott anyagok

Jártassági tesztanyagok	CASRN	Halmazállapot	*In vivo* előrejelzés ([1])	KeratinoSens™ előrejelzés ([2])	$EC_{1,5}$ (μM) referenciatartomány ([3])	IC_{50} (μM) referenciatartomány ([3])
Izopropanol	67-63-0	Folyadék	Nem szenzibilizáló	Negatív	> 1 000	> 1 000
Szalicilsav	69-72-7	Szilárd	Nem szenzibilizáló	Negatív	> 1 000	> 1 000
Tejsav	50-21-5	Folyadék	Nem szenzibilizáló	Negatív	> 1 000	> 1 000
Glicerin	56-81-5	Folyadék	Nem szenzibilizáló	Negatív	> 1 000	> 1 000
Fahéjalkohol	104-54-1	Szilárd	Szenzibilizáló (enyhén)	Pozitív	25–175	> 1 000
Etilén-glikol-dimetakrilát	97-90-5	Folyadék	Szenzibilizáló (enyhén)	Pozitív	5–125	> 500
2-Merkapto-benzotiazol	149-30-4	Szilárd	Szenzibilizáló (mérsékelten)	Pozitív	25–250	> 500
Metil-dibróm-glutár-nitril	35691-65-7	Szilárd	Szenzibilizáló (erősen)	Pozitív	< 20	20–100
4-metil-amino-fenol-szulfát	55-55-0	Szilárd	Szenzibilizáló (erősen)	Pozitív	< 12,5	20–200
2,4-dinitro-klórbenzol	97-00-7	Szilárd	Szenzibilizáló (szélsőségesen)	Pozitív	< 12,5	5–20

([1]) Az in vivo veszélyekre és (a hatáserősségre vonatkozó) előrejelzések LLNA-adatokon alapulnak (13). Az *in vivo* hatáserősség levezetése az ECETOC által javasolt kritériumok segítségével történik (24).

([2]) A KeratinoSens™ előrejelzést integrált értékelési és vizsgálati megközelítés keretében, valamint e vizsgálati módszer 9. és 11. pontjának rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni.

([3]) A megfigyelt történeti értékek alapján (12).

▼M7

3. függelék

A LUMINESZCENCIA-MÉRÉSEK MINŐSÉG-ELLENŐRZÉSE

A KeratinoSens™ vizsgálat során optimális lumineszcencia-mérések biztosításához kapcsolódó alapkísérlet

Ahhoz, hogy a luminométerrel megbízható eredmények szülessenek, az alábbi három paraméter kritikus jelentőségű:

— a kontroll-lyukakban stabil hátteret biztosító, kellő érzékenység legyen;

— ne legyen gradiens a lemezen hosszú leolvasási idők miatt; valamint

— a szomszédos lyukakban ne legyen az erősen aktív lyukak felől érkező fényszennyezés.

A vizsgálat előtt a kontroll-lemez alábbiakban ismertetett beállítás melletti vizsgálatával (hármas elemzéssel) ajánlott meggyőződni a lumineszcencia-mérések megfelelőségéről.

A lemez beállítása az első kísérlethez

	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**	**Vakpróba**

EGDMA = etilén-glikol-dimetakrilát (CAS-szám: 97-90-5), erős indukciót kiváltó vegyi anyag

CA = fahéjaldehid, pozitív referenciaanyag (CAS-szám: 104-55-2)

A minőségellenőrzés céljából végzett elemzésnek a következőket kell bebizonyítania:

— egyértelmű dózis-válasz a D sorban, I_{max} a háttérértékeknek több mint 20-szorosa (a legtöbb esetben 100 és 300 közötti I_{max} értékek kaphatók);

— dózis-válasz hiánya a C és az E sorban (nincs 1,5 feletti – ideális esetben 1,3 feletti – indukciós érték) különösen az EGDMA-t tartalmazó sorban lévő erősen aktív lyukak mellett lehetséges fényszennyezés miatt;

— nincs statisztikailag szignifikáns eltérés az A, B, C, E, F és G sor között (azaz nincs gradiens a lemez felett); továbbá

— az A, B, C, E, F és G sor bármelyikében és a H sorban, DMSO-t tartalmazó lyukakban a variabilitás alacsonyabb 20 %-nál (azaz stabil háttér).

▼M7

B.61. FLUORESZCEIN-SZIVÁRGÁSON ALAPULÓ VIZSGÁLAT A SZEMKORRÓZIÓT ÉS A SÚLYOS SZEMIRRITÁCIÓT OKOZÓ ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA

BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 460. vizsgálati iránymutatásában (2012) leírt módszerrel. A fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer bizonyos körülmények között és konkrét korlátok mellett alkalmazható a vegyi anyagok (anyagok és keverékek) szemkorróziót és súlyos szemirritációt okozóként történő besorolására, amely kategóriákat a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által globálisan harmonizált rendszere (GHS) (1. kategória), az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendelet ([1]) (CLP-rendelet) (1. kategória), valamint az USA Környezetvédelmi Ügynöksége (EPA) (I. kategória) határozta meg (1) (2). E vizsgálati módszer alkalmazásában a súlyos szemirritációt okozó anyagok olyan vegyi anyagok, amelyek a vizsgálati vegyi anyag beadását követően 21 napon belül vissza nem fordítható szövetkárosodást okoznak a szemben, vagy amelyek a látás súlyos fizikai romlását okozzák, míg a szemkorróziót okozó anyagok olyan vegyi anyagok, amelyek visszafordíthatatlan szövetkárosodást okoznak a szemben. E vegyi anyagok az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába, a CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába vagy az US EPA szerinti I. kategóriába sorolt vegyi anyagok.

Míg a fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer nem tekintendő érvényesnek a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatot teljes egészében helyettesítő vizsgálatként, a szabályozói követelmények szerinti osztályozásra és címkézésre szolgáló, többszintű vizsgálati stratégia részeként ajánlott. Ezért a fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer a szemkorróziót/súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítására szolgáló, felülről építkező megközelítés első lépéseként ajánlott, kifejezetten bizonyos vegyianyag-típusok (azaz vízoldékony anyagok és keverékek) esetén (3) (4).

Jelenleg általánosan elfogadott, hogy az előrelátható jövőben egyetlen *in vitro* szemirritációs vizsgálat sem tudja majd helyettesíteni az *in vivo* szemvizsgálatot (B.5. vizsgálati módszer, (5)) a különböző kémiai osztályok okozta irritációk teljes körének előrejelzéséhez. Előfordulhat azonban, hogy egy adott (többszintű) vizsgálati stratégián belüli több alternatív vizsgálati módszer stratégiai kombinációi helyettesíteni tudják az *in vivo* szemvizsgálatot (4). A felülről építkező megközelítés (4) akkor alkalmazandó, amikor a rendelkezésre álló információk alapján valamely vegyi anyag várhatóan rendkívül irritatív potenciállal rendelkezik.

A 35. pontban részletezett előrejelzési modell alapján a fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer korlátozott alkalmazási területen belül további vizsgálat nélkül azonosíthat vegyi anyagokat szemkorróziót/súlyos szemirritációt okozóként (az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába tartozóként, a CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozóként, az US EPA szerinti I. kategóriába tartozóként). Ugyanez feltételezhető a keverékek esetében, bár azokra nem terjedt ki a validálás. Ezért a fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer a B.5. vizsgálati módszer (5) lépcsőzetes vizsgálati stratégiája alapján alkalmazható a vegyi anyagok szemirritációs/szemkorróziós hatásának meghatározásához. A fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszerrel nem szemkorróziót okozóként vagy súlyos szemirritációt okozóként előrejelzett vegyi anyagokat azonban legalább egy olyan további (*in vitro* és/vagy *in vivo*) vizsgálati módszerrel meg kell vizsgálni, amelyek képesek pontosan azonosítani i. a fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálatban *in vitro* hamis negatív szemkorróziót/súlyos szemirritációt okozó (az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába, a CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába és az US EPA szerinti I. kategóriába tartozó) vegyi anyagokat; ii. a szemkorrózió/szemirritáció tekintetében be nem sorolt (az ENSZ-GHS szerinti nem besorolt, a CLP-rendelet szerinti nem besorolt és az US EPA szerinti

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 2008. december 16-i 1272/2008/EK rendelete az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353., 2008.12.31., 1. o.).

▼M7

IV. kategóriába tartozó) vegyi anyagokat; és/vagy iii. a mérsékelten/enyhén szemirritáló (az ENSZ-GHS szerinti 2A. és 2B. kategóriába, a CLP-rendelet szerinti 2. kategóriába és az US EPA szerinti II. és III. kategóriába tartozó) vegyi anyagokat.

E vizsgálati módszer célja a vizsgálati vegyi anyag szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt okozó esetleges hatásának értékelésére alkalmazott eljárások ismertetése annak alapján, hogy az anyag képes-e károsodást előidézni impermeábilis, konfluens felhám-monolayerben. A transzepitheliális permeabilitás integritása a például kötőhártyában és a szaruhártyában megtalálható felhám egyik fő funkciója. A transzepitheliális permeabilitást különféle tight junctionok szabályozzák. Kiderült, hogy a szaruhártyafelhám permeabilitásának *in vivo* körülmények közötti növekedése korrelál a szemirritáció kialakulása során megfigyelt gyulladás és szemfelszín-károsodás mértékével.

A fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszerben a vizsgálati vegyi anyaggal való rövid expozíciós időt követően fellépő toxikus hatásokat a permeábilis inzerteken tenyésztett Madin-Darby kutyavese (MDCK) sejtek felhám-monolayerében áthatoló fluoreszcein-nátrium permeabilitásának növekedésével mérik. A bekövetkező fluoreszcein-szivárgás mennyisége arányos a vegyi anyag által a tight junctionokban, a dezmoszómákban és a sejtmembránokban előidézett károsodással, és felhasználható a vizsgálati vegyi anyag által a szemre kifejtett esetleges toxicitás becsléséhez. Az 1. függelékben található egy diagram a fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszerhez inzert membránján tenyésztett MDCK-sejtekről.

A fogalommeghatározások a 2. függelékben találhatók.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

Ez a vizsgálati módszer a 71. sz. INVITTOX-protokollon (6) alapul, amelynek értékelésére az Alternatív Módszerek Validálásával Foglalkozó Európai Központ (ECVAM), valamint az USA alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottsága (ICCVAM) és az Alternatív Módszerek Validálásával Foglalkozó Japán Központ (JaCVAM) együttműködése keretében végzett nemzetközi validálási vizsgálatban került sor.

A fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer nem ajánlott enyhén/mérsékelten irritálóként besorolandó vegyi anyagok, illetve a szemirritáció tekintetében be nem sorolandó (azaz az ENSZ-GHS szerinti 2A., 2B. kategóriába tartozó, nem besorolt, a CLP-rendelet szerinti 2. kategóriába tartozó, nem besorolt, az US EPA szerinti II., III. és IV. kategóriába tartozó) vegyi anyagok (anyagok és keverékek) azonosítására, ahogyan azt a validálási vizsgálat demonstrálta (3) (7).

A vizsgálati módszer kizárólag a vízoldékony vegyi anyagokra (anyagokra és keverékekre) alkalmazandó. A fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer általában pontosan előrejelzi a vízoldékony vegyi anyagok és/vagy azon vegyi anyagok súlyos szemirritációs potenciálját, amelyeknek a toxikus hatását nem érinti a hígítás (7). Ahhoz, hogy egy vegyi anyagot kísérleti körülmények között vízoldékonyként soroljanak be, steril, (1,0–1,8 mM koncentrációban) kalciumot tartalmazó, fenolvörösmentes Hank-féle kiegyensúlyozott sóoldatban (HBBS-oldat) oldhatónak kell lennie $\geq$ 250 mg/ml (a 100 mg/ml határértéket egy dózissal meghaladó) koncentráció mellett. Ha azonban a vizsgálati vegyi anyag a 100 mg/ml koncentrációnál alacsonyabb koncentrációnál oldható, de már e koncentrációnál 20 % fluoreszcein-szivárgást idéz elő (azaz FL_{20} < 100 mg/ml), még mindig besorolható a GHS szerinti 1. vagy az EPA szerinti I. kategóriába.

E vizsgálati módszer meghatározott korlátai kizárják az alkalmazási körből az erős savakat és bázisokat, a sejtfixáló anyagokat, valamint a rendkívül illékony vegyi anyagokat. E vegyi anyagoknak a fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszerrel nem mért mechanizmusai vannak, ilyen például a kiterjedt koaguláció, a szappanosodás vagy a speciális kémiai reakciók. E vizsgálati módszer más meghatározott korlátai a színes és viszkózus vizsgálati vegyi anyagok esetén érvényes prediktív képességre vonatkozó eredményeken alapulnak (7). A módszerben javasolt, hogy mivel mindkét említett vegyianyag-típus nehezen eltávolítható a monolayerből a rövid expozíciós idő után,

▼M7

a vizsgálati módszer prediktivitása több mosási szakasz alkalmazásával javítható. A folyadékban szuszpendált szilárd vegyi anyagok hajlamosak kicsapódni, és előfordulhat, hogy a sejteket érő végső koncentráció nehezen határozható meg. Ha az említett kémiai és fizikai osztályokba tartozó anyagokat kizárják az adatbázisból, akkor a fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálat pontossága az EU, az EPA és a GHS osztályozási rendszerében egyaránt jelentősen javul (7).

E vizsgálati módszer célját (azaz kizárólag a szemkorróziót, illetve a súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítása) figyelembe véve a hamis negatív arányok (lásd a 13. pontot) jelentősége nem kritikus, hiszen az érintett vegyi anyagokat a szabályozói követelményektől függően – az adatok bizonyító erejének mérlegelésén alapuló megközelítés (5) keretébe tartozó lépcsőzetes vizsgálati stratégia alkalmazásával – később más, megfelelően validált *in vitro* vizsgálatokkal vagy nyulakon végzett vizsgálatokkal is megvizsgálják (lásd még a 3. és a 4. pontot).

A fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer más, meghatározott korlátai a hamisnegatív- és hamis pozitív arányokon alapulnak. Ha felülről építkező megközelítés első lépéseként használták a szemkorróziót/súlyos szemirritációt okozó, vízoldékony anyagok és keverékek (azaz az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába, a CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába, az US EPA szerinti I. kategóriába tartozó anyagok és keverékek) azonosítására, a fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer hamis pozitív aránya *in vivo* eredményekkel összevetve 7 % (7/103; ENSZ-GHS és CLP-rendelet) és 9 % (9/99; US EPA) közé esett, hamis negatív aránya pedig *in vivo* eredményekkel összevetve 54 % (15/28; US EPA) és 56 % (27/48; ENSZ-GHS és CLP-rendelet) közé esett. A fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszerben hamis pozitív és/vagy hamis negatív eredményeket mutató vegyianyag-csoportok itt nincsenek meghatározva.

Bizonyos technikai korlátok az MDCK-sejttenyészetre jellemzőek. A fluoreszcein-nátrium festéknek a monolayeren történő áthaladását blokkoló tight junctionokat a sejtpasszálások számának növekedése egyre inkább veszélyezteti. A tight junctionok hiányos kialakulása következében egyre több fluoreszcein-szivárgás történik a nem kezelt kontrollokban. Ezért fontos a nem kezelt kontrollokban megengedhető maximális szivárgás meghatározása (lásd a 38. pontot: 0 % szivárgás). Az összes *in vitro* vizsgálathoz hasonlóan előfordulhat, hogy a sejtek idővel átalakulnak, ezért elengedhetetlen, hogy a vizsgálatokhoz közöljék a passzálások számának tartományát.

A jelenlegi alkalmazási terület egyes esetekben bővíthető, de csak a tanulmányozott vizsgálati vegyi anyagok kiterjesztett – lehetőleg vizsgálatokkal előállított – adatkészletének elemzését követően (3). Ez a vizsgálati módszer ennek megfelelően frissítés tárgyát fogja képezni az új információk és adatok figyelembevételekor.

Minden olyan laboratóriumnak, amely a vizsgálatot először alkalmazza, a 3. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok felhasználásával ajánlatos meggyőződnie felkészültségéről. Mielőtt a laboratórium a fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálat adatait a szabályozói követelmények szerinti veszélyességi osztályozás céljaira rendelkezésre bocsátaná, e vegyi anyagok vizsgálatával demonstrálhatja a fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer végrehajtásában való szakmai jártasságát.

A VIZSGÁLAT ELVE

A fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer féligáteresztő inzerteken tenyésztett MDCK CB997 sejtvonalhoz tartozó cső alakú felhámsejtek konfluens monolayerében végzett citotoxicitás- és sejtfunkció-alapú *in vitro* vizsgálat, amely sejtek az *in vivo* szaruhártya-felhám nem proliferáló állapotát modellezik. Az MDCK sejtvonal jól bevált sejtvonal, amely a kötőhártya- és a szaruhártya-felhám apikális oldalán megtalálható tight junctionokhoz és dezmoszómákhoz hasonló tight junctionokat és dezmoszómákat alkot. A tight junctionok és a dezmoszómák *in vivo* körülmények között megakadályozzák, hogy oldott anyagok és idegen anyagok hatoljanak a szaruhártya-felhámba. A károsodott tight junctionok és dezmoszómák miatt megszűnő transzepitheliális impermeabilitás a vegyi anyag által előidézett szemirritáció egyik korai eseménye.

▼M7

A vizsgálati vegyi anyagot az inzert apikális oldalán tenyésztett sejtek konfluens rétegére kell felvinni. Rövid, 1 perces expozíciót kell rutinszerűen alkalmazni a humán expozíció során adódó normál kiürülési arány visszaadása érdekében. A rövid expozíciós idő egyik előnye, hogy a víz alapú anyagok és keverékek tisztán vizsgálhatók, ha az expozíciós idő után könnyen eltávolíthatók. Ez lehetővé teszi az eredmények közvetlenebb összehasonlítását a vegyi anyagok emberekre gyakorolt hatásaival. A vizsgálati vegyi anyagot ezt követően el kell távolítani, és a nem toxikus, rendkívül fluoreszcens fluoreszcein-nátrium festéket 30 percre a monolayer apikális oldalán kell hatni hagyni. A vizsgálati vegyi anyag által a tight junctionokban okozott károsodást a sejtrétegen meghatározott időn belül átszivárgó fluoreszcein mennyiségével kell meghatározni.

A monolayeren és az inzert membránján keresztül a lyukban lévő oldat meghatározott térfogatába átkerülő fluoreszcein-nátrium festéket (a fluoreszcein-nátrium festék a lyukba szivárog) a lyukban lévő fluoreszcein-koncentráció spektrofluorométerrel végzett mérésével kell meghatározni. A fluoreszcein-szivárgás (FL) mennyiségét két kontrollon – egy vakpróba-kontrollon és a maximális szivárgást képviselő kontrollon – leolvasott fluoreszcein-intenzitás (FI) értékére hivatkozva kell kiszámítani. A szivárgás százalékos arányát és ennélfogva a tight junctionok károsodásának mértékét e kontrollokhoz viszonyítva kell kifejezni, a vizsgálati vegyi anyag mindegyik meghatározott koncentrációja esetében. Ezt követően ki kell számítani az FL_{20} értéket (azaz azt a koncentrációt, amely a nem kezelt konfluens monolayernél és a sejtek nélküli inzerteknél rögzített értékhez viszonyítva 20 % fluoreszcein-szivárgást okoz). Az FL_{20} (mg/ml) érték a szemkorróziót okozó és a súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosításához tartozó előrejelzési modellben használatos (lásd a 35. pontot).

A visszanyerés a vizsgálati vegyi anyag toxicitási profiljának fontos része, amelyet az *in vivo* szemirritációs vizsgálat szintén értékel. Előzetes elemzések azt jelezték, hogy a visszanyerésre vonatkozó adatok (a vizsgálati vegyi anyagnak való expozíciót követő legfeljebb 72 óráig) fokozhatják a 71. sz. INVITTOX-protokoll prediktív értékét, azonban további értékelésre van szükség, és ahhoz – lehetőleg további vizsgálatokkal előállított – további adatok kellenek (6). Ez a vizsgálati módszer ennek megfelelően frissítés tárgyát fogja képezni az új információk és adatok figyelembevételekor.

ELJÁRÁS

A monolayer sejttenyészet elkészítése

Az MDCK CB997 sejtvonalhoz tartozó sejtekből álló monolayer sejttenyészetet sejttenyésztő lombikban Dulbecco-féle módosított Eagle-féle tápfolyadékban (DMEM) és F12-es tápanyagkeverékben (L-glutaminnal, 15 mM HEPES pufferrel, 1,0–1,8 mM koncentrációjú kalciummal és 10 %-os, melegen deaktivált FCS/FBS szérummal előállított 1-szeres koncentrátumban) fejlődő szubkonfluens sejtek felhasználásával kell elkészíteni. Fontos, hogy a fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálat során alkalmazott valamennyi közegnek/oldatnak a tight junctionok kialakulásának és épségének biztosítása érdekében 1,0 mM (111 mg/l) és 1,8 mM (200 mg/l) közötti koncentrációban kalciumot kell tartalmaznia. A tight junctionok egyenletes és reprodukálható kialakulásának biztosítása érdekében ellenőrizni kell a sejtpasszálások számának tartományát. A sejteknek a felolvasztástól számítva 3–30 közötti passzálási tartományban kell lenniük, mivel az e passzálási tartományon belüli sejtek hasonló funkciójúak, ami elősegíti, hogy a vizsgálati eredmények reprodukálhatóak legyenek.

A fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer végrehajtása előtt a sejteket tripszines emésztéssel le kell választani a lombikról, centrifugálni kell, és megfelelő mennyiségű sejtet le kell oltani a 24-lyukú lemezekre helyezett inzertekbe (lásd az 1. függeléket). A sejtek leoltásához 80–150 μm vastagságú és 0,45 μm méretű pórusokkal rendelkező, vegyes cellulóz-észterekből álló membránokkal ellátott, 12 mm átmérőjű inzerteket kell használni. A validálási vizsgálatban Millicell-HA típusú, 12 mm-es inzerteket használtak. Az inzert- és a membrántípus tulajdonságai fontosak, mivel befolyásolhatják a sejtnövekedést és a kémiai kötést. Egyes vegyianyag-típusok a Millicell-HA típusú inzert membránjához kötődhetnek, ami befolyásolhatja az eredmények értelmezését. Más membránok használata esetén jártassági tesztanyagokat (lásd a 3. függeléket) kell használni az egyenértékűség igazolására.

▼M7

Az inzert membránjához kapcsolódó kémiai kötés gyakoribb a töltéssel rendelkező membránhoz vonzódó kationos vegyi anyagok, például a benzalkónium-klorid esetében (7). Az inzert membránjához kapcsolódó kémiai kötés növelheti a vegyi anyag expozíciós idejét, ami a vegyi anyag toxikus potenciáljának túlbecsléséhez vezet, ugyanakkor fizikailag is csökkentheti az inzerten keresztüli fluoreszcein-szivárgást azáltal, hogy az inzert membránjához kötődő kationos vegyi anyaghoz köti a festéket, ami a vegyi anyag toxikus potenciáljának alulbecsléséhez vezet. Ez könnyen nyomon követhető oly módon, hogy kizárólag a membránt teszik ki a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációjának, és ezt követően a fluoreszcein-nátrium festéket normál koncentráció mellett, standard ideig (sejtkontroll nélkül) kell hozzáadni. Ha a fluoreszcein-nátrium festék kötése bekövetkezik, az inzert membránja a vizsgálati vegyi anyag lemosását követően megsárgul. Ezért ahhoz, hogy értelmezni lehessen a vizsgálati vegyi anyag sejtekre kifejtett hatását, a kötési tulajdonságainak ismerete elengedhetetlen.

A sejtek inzertekre történő leoltásának konfluens monolayert kell létrehozniuk a vizsgálati vegyi anyagnak való expozíció időpontjában. Inzertenként $1{,}6 \times 10^5$ sejtet (400 µl, 4×10^5 sejt/ml sűrűségű sejtszuszpenziót) kell adagolni. E körülmények között 96 órás tenyésztést követően általában konfluens monolayer jön létre. A leoltás előtt az inzerteket szemrevételezéssel kell ellenőrizni, hogy meggyőződjenek arról, hogy a 30. pontban leírt szemrevételezéses ellenőrzéskor rögzített esetleges károsodások a kezelésnek tudhatók be.

Az MDCK sejttenyészeteket párás légkörben, 5 % ± 1 % CO_2-koncentráció mellett és 37 ± 1 °C-on, inkubátorban kell tartani. A sejteknek baktérium-, vírus-, mikoplazma- és gombafertőzéstől mentesnek kell lenniük.

A vizsgálati és a kontrollként szolgáló vegyi anyagok alkalmazása

Minden egyes kísérletmenethez a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó friss törzsoldatot kell készíteni, és azt az elkészítéstől számított 30 percen belül fel kell használni. A szérum-fehérjekötés elkerülése érdekében a vizsgálati vegyi anyagokat (1,0–1,8 mM koncentrációban) kalciumot tartalmazó, fenolvörösmentes HBBS-oldatban kell előkészíteni. A vizsgálati vegyi anyag 250 mg/ml koncentráció melletti, HBBS-oldatban való oldhatóságát a vizsgálat előtt fel kell mérni. Ha a vizsgálati vegyi anyag e koncentráció mellett 30 perc alatt stabil szuszpenziót vagy emulziót alkot (azaz megőrzi egységességét és nem ülepedik le, vagy nem válik szét egynél több fázissá), a HBBS-oldat továbbra is használható oldószerként. Ha azonban megállapítást nyer, hogy a vegyi anyag HBBS-oldatban oldhatatlan e koncentráció mellett, mérlegelni kell a fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszertől eltérő vizsgálati módszerek alkalmazását. Olyan esetekben, ha megállapítást nyer, hogy a vegyi anyag HBBS-oldatban oldhatatlan, körültekintően kell mérlegelni a könnyű ásványolaj oldószerként történő alkalmazását, mivel nem áll rendelkezésre elegendő adat annak megállapításához, hogy a fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálat ilyen körülmények között hogyan teljesít.

Az összes vizsgálandó vegyi anyagot a törzsoldatból, steril, (1,0–1,8 mM koncentrációban) kalciumot tartalmazó, fenolvörösmentes HBBS-oldatban kell előkészíteni öt, előre meghatározott koncentrációban: tömeg per térfogat alapján hígítva (1,25, 100, 250 mg/ml), továbbá egy tiszta vagy telített oldat formájában. Szilárd vegyi anyag vizsgálatakor egy nagyon magas, 750 mg/ml koncentrációt is alkalmazni kell. A vegyi anyag e koncentrációját esetlegesen finnpipettával kell a sejtekre felvinni. Ha a toxicitás 25 és 100 mg/ml közötti koncentráció mellett állapítható meg, az következőkben felsorolt, további koncentrációkat kell kétszer megvizsgálni: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. Az FL_{20} értéket e koncentrációkból kell levezetni, amennyiben az elfogadhatósági kritériumok teljesülnek.

A vizsgálati vegyi anyagokat konfluens monolayerekre kell felvinni a sejttenyésztő közeg eltávolítását és a steril, meleg (37 °C-os), (1,0–1,8 mM koncentrációban) kalciumot tartalmazó, fenolvörösmentes HBBS-oldatban történt kétszeri mosást követően. Ezt megelőzően a szűrőket szemrevételezéssel ellenőrizni kell abból a szempontból, hogy előfordulnak-e rajtuk olyan korábbi rongálódások, amelyeket tévesen tulajdoníthatnának a vizsgálati vegyi anyagokkal való esetleges összeegyeztethetetlenségnek. A vizsgálati vegyi anyag minden egyes koncentrációjához

▼M7

és a kontrollanyagokhoz minden egyes vizsgálatmenetben legalább három párhuzamost kell használni. 1 percig tartó, szobahőmérsékleten végzett expozíciót követően a vizsgálati vegyi anyagot felszívással óvatosan el kell távolítani, a monolayert kétszer át kell mosni steril, meleg (37 °C-os), (1,0–1,8 mM koncentrációban) kalciumot tartalmazó, fenolvörösmentes HBBS-oldattal és a fluoreszcein-szivárgást azonnal meg kell mérni.

A párhuzamos negatív kontrollokat és a párhuzamos pozitív kontrollokat minden egyes vizsgálatmenetben annak bizonyítására kell felhasználni, hogy a sejtek monolayeren belüli integritása (negatív kontrollok) és érzékenysége (pozitív kontrollok) egy meghatározott történeti elfogadhatósági tartományba esik. A pozitív kontrollként javasolt vegyi anyag a 100 mg/ml koncentrációban alkalmazott Brij 35 (CAS-szám: 9002-92-0). E koncentrációnak kb. 30 % fluoreszcein-szivárgást kell biztosítania (a fluoreszcein-szivárgás, azaz a sejtréteg-károsodás elfogadott tartománya: 20–40 %). A negatív kontrollként javasolt vegyi anyag az (1,0–1,8 mM koncentrációban) kalciumot tartalmazó, fenolvörösmentes HBBS-oldat (nem kezelt, vakpróba-kontroll). A FL_{20} értékek kiszámíthatósága érdekében a maximális szivárgást képviselő kontrollt is alkalmazni kell minden egyes vizsgálatmenetben. A maximális szivárgást sejteket nem tartalmazó kontrollinzert felhasználásával kell meghatározni.

A fluoreszcein-permeabilitás meghatározása

Közvetlenül a vizsgálati és a kontrollként szolgáló vegyi anyagok eltávolítását követően 400 µl térfogatú, 0,1 mg/ml koncentrációjú fluoreszcein-nátrium oldatot (0,01 vegyesszázalékos, [1,0–1,8mM koncentrációban] kalciumot tartalmazó, fenolvörösmentes HBBS-oldatban) kell a (például Millicell-HA típusú) inzertekhez adni. A tenyészeteket 30 percig szobahőmérsékleten kell tartani. A fluoreszceinnel végzett inkubálás végén az inzerteket óvatosan el kell távolítani az egyes lyukakból. Minden szűrőn szemrevételezéses ellenőrzést kell végezni, és a kezelés során esetlegesen bekövetkezett károsodásokat rögzíteni kell.

A monolayeren és az inzerten átszivárgott fluoreszcein mennyiségét számszerűsíteni kell az inzertek eltávolítását követően a lyukakban maradt oldatban. A méréseket 485 nm-es gerjesztési hullámhossznál, illetve 530 nm-es kibocsátási hullámhossznál kell elvégezni. A spektrofluorométer érzékenységét úgy kell beállítani, hogy a maximális fluoreszcein-szivárgás (a sejteket nem tartalmazó inzertnél) és a minimális fluoreszcein-szivárgás (negatív kontrollal kezelt konfluens monolayert tartalmazó inzertnél) közötti számszerű eltérés a lehető legmagasabb legyen. A használt spektrofluorométer eltérései miatt olyan érzékenység alkalmazása javasolt, amely a maximális fluoreszcei-szivárgást képviselő kontrollnál 4 000-nél magasabb fluoreszcencia-intenzitást ad. A fluoreszcein-szivárgás maximális értéke nem haladhatja meg a 9 999-et. A fluoreszcein-szivárgás maximális intenzitásának a használt spektrofluorométer lineáris tartományába kell esnie.

Az eredmények értelmezése és az előrejelzési modell

A fluoreszcein-szivárgás mennyiségének arányosnak kell lennie a tight junctionok vegyi anyag által előidézett károsodásával. A vegyi anyag minden vizsgált koncentrációja esetén a fluoreszcein-szivárgás százalékos arányát a vizsgálati vegyi anyagnak a negatív kontroll (a negatív kontrollal kezelt sejtek konfluens monolayerében leolvasott érték) alapján és a maximális szivárgást képviselő kontroll (a sejteket nem tartalmazó inzerten keresztüli fluoreszcein-szivárgás leolvasott értéke) alapján adódó FL-értékekre hivatkozással kapott FL-értékeiből kell kiszámítani

A maximális szivárgás fluoreszcencia-intenzitásának átlaga = x

A 0 %-os szivárgás fluoreszcencia-intenzitásának átlaga = y

A 100 %-os szivárgás átlagát a 0 %-os szivárgás átlagának a maximális szivárgás átlagából való kivonásával kell kiszámítani,

azaz $x - y = z$

Az egyes rögzített dózisok százalékos szivárgását oly módon kell kiszámítani, hogy a 0 %-os szivárgást ki kell vonni a három párhuzamos leolvasás (m) fluoreszcencia-intenzitása átlagából, és a kapott értéket el kell osztani a 100 %-os szivárgással, azaz $\%FL = [(m-y) / z] \times 100\ \%$, ahol:

▼M7

m = az érintett koncentrációra vonatkozó három párhuzamos mérés fluoreszcencia-intenzitásának átlaga

% FL = a sejtrétegen átszivárgó fluoreszcein százalékos aránya

A 20 % fluoreszcein-szivárgást okozó vegyianyag-koncentráció kiszámítására szolgáló alábbi egyenletet kell alkalmazni:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

ahol:

D = a gátlás %-os aránya

A = a károsodás %-os aránya (20 % fluoreszcein-szivárgás)

B = a fluoreszcein-szivárgás %-os aránya < A

C = a fluoreszcein-szivárgás %-os aránya > A

M_C = C koncentrációja (mg/ml-ben)

M_B = B koncentrációja (mg/ml-ben)

Az alábbiakban szerepel az az FL_{20} határérték, amelynek segítségével előrejelezhető a vegyi anyagok szemkorróziót/súlyos szemirritációt okozókénti besorolása:

FL_{20} (mg/ml)	ENSZ-GHS szerinti O&C	CLP-rendelet szerinti O&C	US EPA szerinti O&C
≤ 100	1. kategória	1. kategória	I. kategória

O&C: osztályozás és címkézés,

A fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer csak a vízoldékony, szemkorróziót okozó és súlyos szemirritációt okozó (az ENSZ-GHS szerinti 1. kategóriába, a CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába, az US EPA szerinti I. kategóriába tartozó) anyagok azonosításához ajánlott (lásd az 1. és a 10. pontot).

Ahhoz, hogy a vízoldékony vegyi anyagokat (anyagokat és keverékeket (3) (6) (7) „súlyos szemkárosodást okozóként” (az ENSZ-GHS/a CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozóként) vagy „szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt okozóként” (az US EPA szerinti I. kategóriába tartozóként) azonosítsanak, a vizsgálati vegyi anyag FL_{20} értéke legfeljebb 100 mg/ml lehet.

Az eredmények elfogadása

A maximális fluoreszcein-szivárgás átlagának (x) nagyobbnak kell lennie 4 000-nél (lásd a 31. pontot), a 0 %-os szivárgás átlaga (y) legfeljebb 300 lehet, a 100 %-os szivárgás átlagának (z) pedig 3 700 és 6 000 közé kell esnie.

Egy-egy vizsgálat akkor minősül elfogadhatónak, ha a pozitív kontroll 20–40 %-os károsodást okozott a sejtrétegben (melynek mérésére a %-os fluoreszcein-szivárgás szolgál).

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

Az egyes vizsgálatmenetek esetében az egyes párhuzamos lyukakból származó adatokat (például minden vizsgálati vegyi anyag esetében a fluoreszcencia-intenzitás értékeit és a fluoreszcencia-szivárgás kiszámított százalékos adatait, beleértve a besorolást is) táblázatos formában kell jelentésbe foglalni. Ezen túlmenően az egyes párhuzamos mérések átlagait ± szórását minden egyes vizsgálatmenetben jelentésbe kell foglalni.

▼M7

Vizsgálati jegyzőkönyv

A Vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyagok és kontrollként szolgáló vegyi anyagok

— kémiai név (nevek): a Chemical Abstracts Service (CAS) szerinti szerkezeti név, ezt követően az egyéb ismert nevek, ha vannak;

— a vegyi anyag CAS-száma, ha ismert;

— az anyag vagy keverék tisztasága és összetétele (tömegszázalékban), a rendelkezésre álló információknak megfelelően;

— a vizsgálat elvégzése szempontjából lényeges fizikai-kémiai tulajdonságok (például fizikai állapot, illékonyság, pH, stabilitás, vízoldékonyság, kémiai osztály);

— a vizsgálati/kontrollként szolgáló vegyi anyag vizsgálatot megelőző kezelése, ha történt ilyen (például melegítés, porítás);

— tárolási feltételek.

Az alkalmazott vizsgálati módszer és protokoll indokolása

— tartalmaznia kell a vizsgálati módszer alkalmazási területére és korlátaira vonatkozó megfontolásokat.

Vizsgálati körülmények

— a használt sejtrendszer leírása, beleértve a sejtvonal eredetiségigazolását és mikoplazma-állapotát is;

— az alkalmazott vizsgálati eljárás részletei;

— a vizsgálati vegyi anyagok alkalmazott koncentrációja (koncentrációi);

— a vizsgálati vegyi anyagnak való expozíció időtartama;

— a fluoreszceinnel végzett inkubálás időtartama;

— a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása;

— az alkalmazott értékelési kritériumok leírása;

— utalás a modellel kapcsolatos történeti adatokra (például negatív és pozitív kontrollok, referencia-vegyianyagok, ha vannak ilyenek);

— a laboratórium igazolt szakmai jártasságára vonatkozó adatok.

Eredmények

— az egyes vizsgálati vegyi anyagokra és kontrollokra vonatkozó adatok táblázatos bemutatása minden egyes vizsgálatmenet és párhuzamos mérés esetében (beleértve az egyes eredményeket, az átlagokat és a szórást);

— az alkalmazott előrejelzési modellre és/vagy döntési kritériumokra hivatkozással meghatározott osztályozás(ok);

— a megfigyelt egyéb hatások leírása.

▼M7

Az eredmények tárgyalása

— tartalmaznia kell a vizsgálat nem meggyőző kimenetelére vonatkozó megfontolásokat (35. pont: FL_{20} > 100 mg/ml) és további vizsgálatokat.

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Elérhető a következő címen: [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) E melléklet *Akut szemirritáció/*szemkorrózió című, B.5. fejezete

(6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Elérhető a következő címen: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu

(7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.

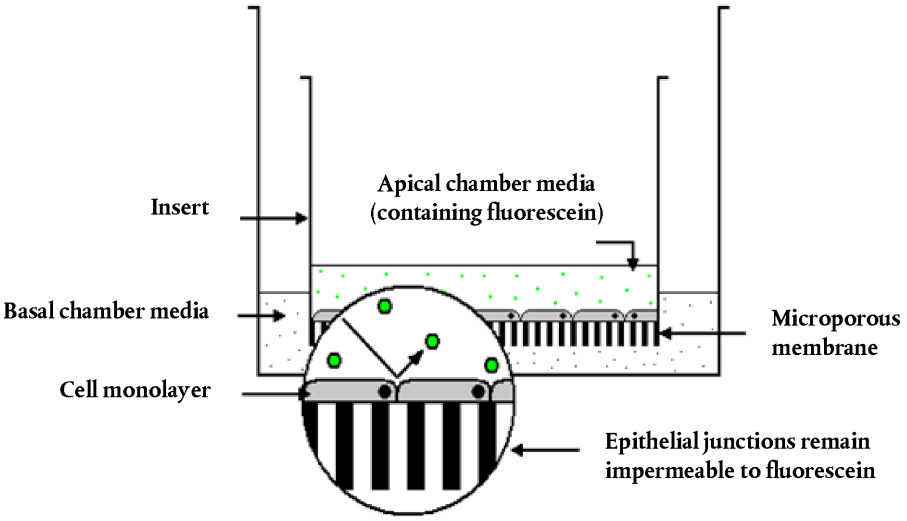
(8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.

▼M7

1. függelék

A FLUORESZCEIN-SZIVÁRGÁSON ALAPULÓ VIZSGÁLATI MÓDSZERHEZ INZERT MEMBRÁNJÁN TENYÉSZTETT MDCK SEJTEKET ÁBRÁZOLÓ DIAGRAM

MDCK sejtek konfluens rétegét egy inzert féligáteresztő membránján kell tenyészteni. Az inzerteket 24-lyukú lemezek lyukaiba kell helyezni.



Ábra forrása: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

▼M7

2. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítőképességét mutatja, és relevanciájának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés” szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálati módszer milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

EPA szerinti I. Kategória: 21 napnál hosszabb ideig fennálló szemkorróziót (a szem szöveteiben visszafordíthatatlan pusztulást) vagy szaruhártya-elváltozást vagy -irritációt okozó vegyi anyag (2).

CLP-rendelet (az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EU rendelet): a vegyi anyagok (anyagok és keverékek) osztályozásának az ENSZ által kidolgozott globálisan harmonizált rendszerét (GHS) az Európai Unióban (EU) végrehajtó rendelet.

Hamis negatív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen negatívnak minősített pozitív vegyi anyagok részaránya. A hamis negatív arány a vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

Hamis pozitív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen pozitívnak minősített negatív vegyi anyagok részaránya. A hamis pozitív arány a vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

FL_{20}: azon koncentráció meghatározásával becsülhető meg, amelynél a vizsgálati vegyi anyag a sejtrétegen keresztül 20 %-os fluoreszcein-szivárgást okoz.

Fluoreszcein-szivárgás: a sejtrétegen átjutó fluoreszcein spektrofluorométerrel mért mennyisége.

GHS (a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az ENSZ által globálisan harmonizált rendszere): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását.

GHS szerinti 1. kategória: a vizsgálati vegyi anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a beadást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

Keverék: az ENSZ-GHS összefüggésében olyan, két vagy több anyagból álló keverék vagy oldat, amelyben ezek az anyagok nem lépnek egymással reakcióba.

Negatív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó kezeletlen replikátum. Ezt a mintát a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt kell feldolgozni annak megállapításához, hogy az oldószer kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

▼M7

Nem besorolt: az ENSZ-GHS szerinti 1., 2A. vagy 2B., a CLP-rendelet szerinti 1. vagy 2., vagy az US EPA szerinti I., II. vagy III. kategóriába szemirritációt okozóként nem besorolt vegyi anyagok.

Szemkorróziót okozó anyag: a) a szemben visszafordíthatatlan szövetkárosodást okozó vegyi anyag; b) az ENSZ-GHS szerinti 1., a CLP-rendelet szerinti 1., vagy az US EPA szerinti I. kategóriába besorolt, szemirritációt okozó vegyi anyag.

Szemirritációt okozó anyag: a) olyan vegyi anyag, amelynek a szem külső felületére való felvitele visszafordítható elváltozást okoz; b) az ENSZ-GHS szerinti 2A. vagy 2B., a CLP-rendelet szerinti 2., vagy az US EPA szerinti II. vagy III. kategóriába besorolt, szemirritációt okozó vegyi anyag.

Súlyos szemirritációt okozó anyag: a) olyan vegyi anyag, amelynek a szem külső felületére való felvitele a beadást követően 21 napon belül vissza nem fordítható szövetkárosodást vagy a látás súlyos fizikai romlását okozza; b) az ENSZ-GHS szerinti 1., a CLP-rendelet szerinti 1., vagy az US EPA szerinti I. kategóriába besorolt, szemirritációt okozó vegyi anyag.

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó vegyi anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Jártassági tesztanyagok: a referencia-vegyianyagok jegyzékén belüli alcsoport, amelyet a tapasztalattal nem rendelkező laboratóriumok a validált referencia-vizsgálatimódszerben való jártasságuk igazolására használhatnak fel.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (8).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik.

Helyettesítő vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek célja, hogy a veszélyek azonosítására és/vagy kockázatértékelésre rutinszerűen alkalmazott és elfogadott vizsgálatot helyettesítse, és amelyről megállapították, hogy az elfogadott vizsgálattal összehasonlítva, az összes lehetséges vizsgálati helyzetben és vegyi anyag esetében a humán vagy állati egészség egyenértékű vagy jobb védelmét biztosítja.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (8).

Súlyos szemkárosodás: a vizsgálati vegyi anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a beadást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben.

Oldószeres/vivőanyagos kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét az oldószerrel vagy vivőanyaggal együtt tartalmazó nem kezelt minta, amelyet a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt kell feldolgozni az ugyanazon oldószerben feloldott vagy ugyanazon vivőanyaggal felvitt vizsgálati vegyi anyaggal kezelt minták kiindulási értékeinek megállapítása

▼M7

érdekében. Párhuzamos negatív kontrollal elvégzett vizsgálata esetén ez a minta azt is bizonyítja, hogy az oldószer vagy vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Specifikusság: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében.

Anyag: az ENSZ-GHS összefüggésében használt fogalom a természetes állapotban előforduló vagy ipari termelőfolyamatból származó kémiai elemekre és azok vegyületeire, amelyek a termék stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagokat és az alkalmazott folyamatból származó szennyeződéseket is tartalmazhatnak, de nem tartalmaznak olyan oldószereket, amelyek az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltozása nélkül elkülöníthetők.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Többszintű vizsgálati stratégia: olyan lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amelynek keretében a vizsgálati vegyi anyagra vonatkozó valamennyi információt meghatározott sorrendben áttekintik, és az egyes szinteken az adatok bizonyító erejének elemzésével meghatározzák, hogy a következő szintre való továbblépés előtt a veszélyességi osztályozásra vonatkozó döntéshez elegendő információ áll-e rendelkezésre. Ha a vizsgálati vegyi anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján megállapítható, további vizsgálatra nincs szükség. Ha a vizsgálati vegyi anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján nem állapítható meg, több lépcsőben egymás után állatkísérleteket kell végezni mindaddig, amíg az egyértelmű besorolás meg nem állapítható.

Validált vizsgálati módszer: olyan vizsgálati módszer, amelynek az adott céllal kapcsolatos relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága validálási vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a validált vizsgálati módszer a javasolt felhasználási célra nem feltétlenül kínál megfelelő pontosságú és megbízhatóságú elfogadható eljárást (8).

Az adatok bizonyító erejének mérlegelése: a rendelkezésre álló különféle érvek és ellenérvek mérlegelésének folyamata az adott vegyi anyag veszélyességével kapcsolatban a megfelelő következtetés levonása és alátámasztása céljából.

▼M7

3. függelék

JÁRTASSÁGI TESZTANYAGOK A FLUORESZCEIN-SZIVÁRGÁSON ALAPULÓ VIZSGÁLATI MÓDSZERHEZ

E vizsgálati módszer rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1. táblázatban ajánlott 8 vegyi anyag szemkorróziót érintő veszélyességi osztályozásának helyes meghatározásával kell igazolniuk szakmai jártasságukat. E vegyi anyagok kiválasztása úgy történt, hogy a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (405. vizsgálati iránymutatás, B.5. vizsgálati módszer (5)) alapján a lokális szemirritáció/szemkorrózió (azaz az ENSZ-GHS szerinti 1., 2A. és 2B. kategória, valamint az ENSZ-GHS rendelet szerinti nem besorolt) hatástartománya szempontjából reprezentatívak legyenek. A fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer validált alkalmazási körét (azaz kizárólag a szemkorróziót, illetve a súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítását) figyelembe véve azonban a jártasság igazolása osztályozási célból csak két vizsgálati kimenetelre (szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt okozó, vagy szemkorróziót, illetve súlyos szemirritációt nem okozó) értelmezhető. A kiválasztás másik kritériuma az volt, hogy a vegyi anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, azokra vonatkozóan kiváló minőségű *in vivo* referenciaadatok álljanak rendelkezésre, és a fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer alapján kiváló minőségű *in vitro* adatok álljanak rendelkezésre. Ezen okból kifolyólag a jártassági tesztanyagok kiválasztása a „Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing” (8) című, a fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer visszamenőleges validálásához felhasznált dokumentum alapján történt.

1. táblázat

A fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszerben való szakmai jártasság ellenőrzéséhez ajánlott vegyi anyagok

Vegyi anyag	CASRN	Kémiai osztály ([1])	Halmazállapot	*In vivo* besorolás ([2])	*In vitro* besorolás ([3])
Benzalkónium-klorid (5 %)	8001-54-5	Óniumvegyület	Folyadék	1. kategória	Szemkorróziót/súlyos szemirritációt okozó anyag
Prometazin-hidroklorid	58-33-3	Amin/amidin, heterociklikus, szerves kénvegyület	Szilárd	1. kategória	Szemkorróziót/súlyos szemirritációt okozó anyag
Nátrium-hidroxid (10 %)	1310-73-2	Lúg	Folyadék	1. kategória	Szemkorróziót/súlyos szemirritációt okozó anyag
Nátrium-lauril-szulfát (15 %)	151-21-3	Karbonsav (só)	Folyadék	1. kategória	Szemkorróziót/súlyos szemirritációt okozó anyag
4-karboxi-benzaldehid	619-66-9	Karbonsav, aldehid	Szilárd	2(A.) kategória	Szemkorróziót nem okozó/Súlyos szemirritációt nem okozó
Ammónium-nitrát	6484-52-2	Szervetlen só	Szilárd	2(A.) kategória	Szemkorróziót nem okozó/Súlyos szemirritációt nem okozó
Etil-2-metilaceto-acetát	609-14-3	Keton, észter	Folyadék	2(B.) kategória	Szemkorróziót nem okozó/Súlyos szemirritációt nem okozó
Glicerin	56-81-5	Alkohol	Folyadék	Kategória nélküli	Szemkorróziót nem okozó/Súlyos szemirritációt nem okozó

Rövidítések: CASRN= a Chemicals Abstract Service szerinti nyilvántartási szám

([1]) Az egyes vegyi anyagok kémiai osztályának meghatározása standard osztályozási rendszer alkalmazásával, a National Library of Medicine „Medical Subject Headings” (MeSH) elnevezésű osztályozási rendszere (elérhető a következő címen: http//www.nlm.nih.gov/mesh) alapján történt.

([2]) A nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (az OECD 405. vizsgálati iránymutatása, a B.5. vizsgálati módszer) eredményei alapján, valamint az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet felhasználásával.

([3]) A fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszerrel kapott eredmények alapján (71(6). sz. INVITTOX-protokoll)

▼M7

B.62. LÚGOS KÖZEGBEN VÉGZETT *IN VIVO* ÜSTÖKÖSVIZSGÁLAT EMLŐSÖKÖN

BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 489. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. A lúgos közegben végzett *in vivo* üstökösvizsgálat (egysejtes gélelektroforézis) (a továbbiakban egyszerűen: üstökösvizsgálat) állatok – rendszerint rágcsálók – potenciálisan genotoxikus anyag(ok)nak kitett több szövetéből izolált sejtekben vagy sejtmagokban bekövetkező DNS-száltörések kimutatására használatos. Az üstökösvizsgálatot különféle szakértői csoportok felülvizsgálták, és arra vonatkozóan ajánlásokat tettek közzé (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). E vizsgálati módszer a genetikai toxikológiai vizsgálati módszerek sorozatának részét képezi. Kidolgozásra került egy, a genetikai toxikológiai vizsgálatokról tömör tájékoztatást nyújtó, a vizsgálati iránymutatások közelmúltbeli változásait áttekintő OECD-dokumentum (11).

Az üstökösvizsgálat célja a DNS-károsodást okozó vegyi anyagok azonosítása. Az üstökösvizsgálat lúgos közegben (> pH 13) kimutathatja azokat az egyszeres és kettős DNS-száltöréseket, amelyek például a DNS-sel, az alkalikus közegben labilis helyekkel való közvetlen kölcsönhatásból vagy a DNS kivágásos reparációja miatti átmeneti DNS-száltörésekből fakadnak. E száltörések reparálódhatnak tartós hatás bekövetkezése nélkül, okozhatnak sejthalált, vagy rögzülhetnek tartós, életképes változást eredményező mutációban. Okozhatnak kromoszómakárosodást is, amely számos emberi betegséggel, többek között a rákkal is összefügg.

A rágcsálókon végzett üstökösvizsgálat hivatalos validációs kísérletét 2006–2012 között, az Alternatív Módszerek Validálásával Foglalkozó Japán Központ (JaCVAM) koordinálása mellett, az Alternatív Módszerek Validálásával Foglalkozó Európai Központ (ECVAM), az alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottság (ICCVAM) és az Országos Toxikológiai Program (NTP) Alternatív Toxikológiai Módszerek Értékelésével Foglalkozó Ügynökségközi Központja (NICEATM) (12) közreműködésével végezték. Ez a vizsgálati módszer tartalmazza az üstökösvizsgálat ajánlott alkalmazását és korlátait, emellett a validálási kísérlet során felhasznált végleges protokollon (12), valamint további releváns, közzétett és közzé nem tett (laboratóriumi védett) adatokon alapul.

A kulcsfontosságú fogalmak meghatározásai az 1. függelékben találhatók. Megjegyzendő, hogy ehhez a vizsgálathoz számos különböző platform használható (mikroszkóp-tárgylemezek, gél-spotok, 96-lyukú lemezek stb.). Praktikus okokból e dokumentum fennmaradó részében végig a „tárgylemez” kifejezés használatos, de magában foglalja az összes többi platformot is.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

Az üstökösvizsgálat az eukarióta sejtekben bekövetkező DNS-száltörések mérésére szolgáló módszer. A tárgylemezen lévő agarózba helyezett különálló sejteket/sejtmagokat detergenssel, magas sókoncentráció mellett lizálni kell. A lízis szakasza digerálja a sejtek és a sejtmagok membránját, továbbá lehetővé teszi az általában nukleoidoknak és DNS-fragmensnek nevezett spirálszerű DNS-hurkok kioldódását. A magas pH melletti elektroforézis üstökösre emlékeztető szerkezeteket eredményez, amelyek – megfelelő fluoreszcens festékek használatával – fluoreszcens mikroszkópos vizsgálattal megfigyelhetők; a DNS-fragmensek a méretükből adódóan a „magtól” a „csóváig” vándorolnak, és az üstököscsóva intenzitásának az összes intenzitáshoz (a mag és a csóva együttvéve) viszonyított aránya a DNS-töredezettség mértékét tükrözi (13) (14) (15).

A lúgos közegben végzett *in vivo* üstökösvizsgálat különösen releváns a genotoxikus veszély értékeléséhez, amennyiben a vizsgálatra adott válaszok az *in vivo* felszívódástól, eloszlástól, metabolizmustól és kiválasztástól (ADME: absorption, distribution, metabolism, excretion), valamint a DNS-reparációs folyamatoktól is függnek. Ezek a fajoktól, a szövetektől és a DNS-károsodás típusaitól függően változhatnak.

▼M7

Az állatjólétre vonatkozó követelmények teljesítése, különösen az állatok alkalmazásának visszaszorítása (3R-elv – Replacement, Reduction, Refinement; az állatkísérletek helyettesítése, csökkentése, finomítása) érdekében ez a vizsgálat beépíthető más toxikológiai vizsgálatokba, például ismételt dózisú toxicitási vizsgálatokba (10) (16) (17), vagy a végpont ötvözhető más genotoxicitási végpontokkal, például az *in vivo* emlős eritrocita mikronukleusz-vizsgálattal (18) (19) (20). Üstökösvizsgálatot leggyakrabban rágcsálókon végeznek, bár alkalmazzák más emlősfajokra és emlősöktől eltérő fajokra is. A rágcsálóktól eltérő fajok alkalmazását tudományos és etikai szempontból eseti alapon meg kell indokolni, és kifejezetten ajánlott, hogy üstökösvizsgálatot rágcsálóktól eltérő fajokon csak másik toxicitásvizsgálat keretében végezzenek, nem pedig önálló vizsgálatként.

Az expozíciós út és a vizsgálandó szövet(ek) kiválasztását a vizsgálati vegyi anyagokra vonatkozóan rendelkezésre álló/létező összes ismeret alapján kell meghatározni, például a tervezett/várható emberi expozíciós út, metabolizmus és eloszlás, az érintkezés helyén kiváltott esetleges hatások, szerkezeti figyelmeztető jelek, genotoxicitásra vagy toxicitásra vonatkozó egyéb adatok, valamint a vizsgálat célja alapján. Ezért adott esetben a vizsgálati vegyi anyagok genotoxikus potenciálját meg lehet vizsgálni a rákkeltő és/vagy más toxikus hatás célszövetében/célszöveteiben. Ez a vizsgálat valamely *in vitro* rendszer által kimutatott genotoxicitás további vizsgálatához is hasznosnak minősül. A vizsgált szövetben akkor helyénvaló in vivo üstökösvizsgálatot végezni, ha ésszerűen lehet számítani a vizsgált szövet megfelelő expozíciójára.

A vizsgálat legkiterjedtebb validálására eddig együttműködésen alapuló vizsgálatok, például a JaCVAM által (12) és Rothfuss és társai által 2010-ben végzett kísérlet (10) keretében, hímivarú patkányok szomatikus szöveteiben került sor. A JaCVAM nemzetközi validálási kísérletben májat és gyomrot használtak. A májat azért, mert a legaktívabb szerv a vegyi anyagok anyagcseréjében és azért is, mert gyakori célszerv a karcinogenitás vizsgálatához. A gyomrot azért használták, mert az orális expozíciót követően általában a gyomor a vegyi anyagokkal való első érintkezés helye, bár a gyomor-bél traktus más területeit, például a patkóbelet és az éhbelet is figyelembe kell venni az érintkezési hely szöveteiként, amelyek relevánsabbnak tekinthetők az emberi gyomor, mint a rágcsálók mirigyes gyomra tekintetében. Ügyelni kell annak biztosítására, hogy ezek a szövetek ne legyenek kitéve a vizsgálati vegyi anyag túl magas koncentrációinak (21). Ez az eljárás elvileg minden olyan szövetre alkalmazható, amelyekből elemezhető, egysejtes szuszpenziók vagy sejtmagszuszpenziók állíthatók elő. Több laboratórium védett adatai igazolják, hogy sikeresen alkalmazható sok különféle szövetnél, és számos olyan kiadvány létezik, amelyekből kiderül, hogy az eljárás alkalmazható májtól és gyomortól eltérő szervekre vagy szövetekre, például az éhbélre (22), a vesére (23) (24), a bőrre (25) (26), vagy a húgyhólyagból (27) (28), a tüdő- és bronchoalveoláris mosásból származó (a belélegzett vegyi anyagok vizsgálata szempontjából releváns) sejtekre (29) (30), a vizsgálatokat emellett elvégezték több szerven is (31) (32).

Bár a csírasejtekre kifejtett genotoxikus hatások érdekesek lehetnek, meg kell jegyezni, hogy a lúgos közegben végzett standard üstökösvizsgálat, ahogyan e vizsgálati módszer leírásában szerepel, az érett csírasejtekben végbemenő DNS-száltörések méréséhez nem tekintendő megfelelőnek. Mivel a csírasejt-genotoxicitásra irányuló üstökösvizsgálat (33) alkalmazásával kapcsolatos szakirodalmi áttekintésben a DNS-károsodásra vonatkozóan magas és változó szintű háttérértékeket közöltek, az érett csírasejtekre (például spermára) irányuló üstökösvizsgálatnak a vizsgálati módszerbe való beépíthetősége előtt szükség lehet a protokoll módosítására, valamint jobb szabványosítási és validálási vizsgálatokra. Ezen túlmenően az e vizsgálati módszerben ismertetett, ajánlott expozíciós séma nem optimális, és az érett spermában bekövetkező DNS-száltörések érdemi elemzéséhez hosszabb expozíciós vagy mintavételi időre lenne szükség. A szakirodalomban a különböző differenciálódási szakaszokban lévő heresejteken végzett üstökösvizsgálattal mért genotoxikus hatásokról számoltak be (34) (35). Megjegyzendő azonban, hogy az ivarmirigyek szomatikus és csírasejteket egyaránt tartalmaznak. Ezen okból kifolyólag a teljes ivarmirigyben (herében) kapott pozitív eredmények nem feltétlenül tükröznek csírasejt-károsodást, mindazonáltal azt jelzik, hogy a vizsgálati vegyi anyag(ok) és/vagy metabolitjai(k) elérték az ivarmirigyet.

▼M7

Az üstökösvizsgálat standard kísérleti körülményei mellett a keresztkötések nem mutathatók ki megbízhatóan. Bizonyos, módosított kísérleti körülmények mellett a DNS-DNS és a DNS-fehérje keresztkötések és más bázismódosulások, például oxidálódott bázisok mutathatók ki (23) (36) (37) (38) (39). A protokoll szükséges módosításainak megfelelő jellemzéséhez azonban további munkára lenne szükség. Ezért az itt ismertetett vizsgálatnak nem a keresztkötő ágensek kimutatása az elsődleges célja. A vizsgálat még módosításokkal együtt sem megfelelő az aneugének kimutatására.

A tudomány jelenlegi állása miatt az *in vivo* üstökösvizsgálathoz több további korlát kapcsolódik (lásd a 3. függeléket). A vizsgálati módszer a jövőben várhatóan felülvizsgálat tárgyát fogja képezni, és szükség esetén a szerzett tapasztalatok fényében is felülvizsgálatra kerül.

A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az állatokat megfelelő módon kell a vizsgálati vegyi anyagnak kitenni. Az adagolás és a mintavétel részletes leírása a 36–40. pontban található. A kiválasztott mintavételi időpont(ok)ban a vizsgált szöveteket preparálni kell, majd egysejtes szuszpenziókat vagy sejtmagszuszpenziókat kell készíteni (hasznosnak ítélt esetben, például máj esetében *in situ* perfúzió végezhető), és azokat puha agarba kell ágyazni, hogy ne mozduljanak el a tárgylemezeken. A sejteket/sejtmagokat lízispufferrel kell kezelni a sejt és/vagy a sejtmag membránjának eltávolítása érdekében, és erős lúgnak (például pH≥13) kell kitenni a DNS kitekeredésének, valamint a kilazult DNS-hurkok és -fragmensek kioldódásának lehetővé tétele érdekében. Az agarban lévő sejtmag-DNS-t ezt követően elektroforézisnek kell alávetni. A rendes, nem fragmentált DNS-molekulák abban a helyzetben maradnak, amelyben a sejtmag-DNS volt az agarban, míg a fragmentált DNS-ek és a kilazult DNS-hurkok az anód felé vándorolnak. Az elektroforézist követően a DNS-t megfelelő fluoreszcens festék segítségével kell megjeleníteni. A preparátumokat mikroszkóp, valamint teljesen vagy félig automatizált képelemző rendszerek segítségével kell elemezni. Az elektroforézis során történő DNS-vándorlás mértéke és távolsága a DNS-fragmensek mennyiségét és méretét tükrözi. Az üstökösvizsgálat esetében több végpont van. A DNS-károsodás vizsgálatához a csóvában lévő DNS-tartalom (csóva DNS %-os aránya vagy a csóva intenzitásának %-os aránya) ajánlott (12) (40) (41) (42). Elegendő számú sejtmag elemzését követően a vizsgálati eredmények elbírálása érdekében az adatokat megfelelő módszerekkel kell elemezni.

Megjegyzendő, hogy a módszertan különböző aspektusainak – többek között a minták preparálásának, az elektroforézis feltételeinek, a vizuális elemzési paramétereknek (például a festék intenzitásának, a mikroszkóp-izzófény intenzitásának, illetve a mikroszkópszűrő- és -kameradinamikák használatának) és a környezeti feltételeknek (például a háttérvilágításnak) – a módosítása vizsgálat tárgyát képezte és befolyásolhatja a DNS-vándorlást (43) (44) (45) (46).

A LABORATÓRIUM JÁRTASSÁGÁNAK IGAZOLÁSA

Az egyes laboratóriumoknak az üstökösvizsgálatban való kísérleti szakértelmüket annak demonstrálásával kell igazolniuk, hogy mindegyik alkalmazott faj mindegy egyes célszövete esetében képesek megfelelő minőségű egysejtes szuszpenziókat vagy sejtmagszuszpenziókat előállítani. A preparátumok minőségét először a vivőanyaggal kezelt állatok reprodukálhatóan alacsony tartományba eső %-os csóva DNS-ével kell értékelni. A jelenlegi adatok szerint a patkánymájban a csóva DNS %-os arányának csoportos átlaga (a mediánok átlaga alapján, e kifejezések részletezését lásd az 57. pontban) lehetőleg ne haladja meg a 6 %-ot, ami összhangban lenne a JaCVAM validálási kísérletében (12) szereplő értékekkel, valamint más, közzétett és védett adatokkal. Jelenleg nem áll rendelkezésre elég információ ahhoz, hogy az egyéb szövetek esetében optimális vagy elfogadható

▼M7

tartományokra vonatkozóan ajánlásokat lehessen megfogalmazni. Ez indokolt esetben nem zárja ki eleve más szövetek alkalmazását. A Vizsgálati jegyzőkönyvnek megfelelő áttekintést kell adnia az e szövetekben végrehajtott üstökösvizsgálat teljesítőképességéről, a közzétett szakirodalomra vagy a védett adatokra hivatkozással. Először is a csóva DNS %-os arányának a kontrollokban lehetőleg alacsony tartományban kell lennie ahhoz, hogy pozitív hatás kimutatásához kellően dinamikus tartományt lehessen biztosítani. Másodszor, az egyes laboratóriumoknak képesnek kell lenniük arra, hogy a különböző hatásmechanizmusú, az 1. táblázatban javasolt direkt mutagén és a promutagén anyagok esetében reprodukálják a várt válaszokat (lásd a 29. pontot).

Adott esetben ki lehet választani pozitív anyagokat például a JaCVAM validálási kísérletéből (12) vagy más közzétett adatok alapján (lásd a 9. pontot), a választást meg kell indokolni, és a vizsgált szövetekben kiváltott, egyértelmű pozitív válaszokat demonstrálni kell. Az ismert mutagének, például az alacsony dózisban adagolt EMS elenyésző hatásának kimutatására való képességet is igazolni kell, például megfelelő számú és elosztású dózisokkal fennálló dózis-válasz összefüggések létrehozásával. Eleinte a leggyakrabban használt szövetek, például a rágcsálómáj tekintetében szerzett jártasságra kell összpontosítani, ahol a meglévő adatokkal és a várt eredményekkel összehasonlítást lehet végezni (12). Más szövetekből, például a gyomorból, a patkóbélből, az éhbélből, a vérből stb. származó adatokat egyszerre kell összegyűjteni. A laboratóriumnak minden vizsgálni tervezett faj minden egyes szövete tekintetében igazolnia kell a jártasságát, továbbá azt, hogy egy ismert mutagénnel (például EMS-sel) elfogadható pozitív válasz kapható az adott szövetben.

A vivőanyagos/a negatív kontrollokra vonatkozó adatokat össze kell gyűjteni a negatív adatválaszok reprodukálhatóságának igazolása, valamint annak megállapítása érdekében, hogy a vizsgálat technikai aspektusait megfelelően kontrollálták, illetve annak jelzésére, hogy a kontrollok történeti tartományát újra létre kell hozni (lásd a 22. pontot).

Megjegyzendő, hogy míg boncoláskor többféle szövet begyűjthető és feldolgozható üstökösvizsgálat céljából, a laboratóriumnak jártasnak kell lennie egyetlen állat többféle szövetének begyűjtésében, biztosítva ezáltal, hogy egyetlen potenciális DNS-károsodás se vesszen el és az üstökösvizsgálat ne kerüljön veszélybe. Az eutanáziától a szövetek feldolgozás céljából végzett eltávolításáig eltelt idő kritikus jelentőségű lehet (lásd a 44. pontot).

Az e vizsgálatban való jártasság kialakítása során figyelembe kell venni az állatjólétet, ennélfogva az egyéb vizsgálatok során felhasznált állatok szövetei felhasználhatók a vizsgálat különböző aspektusaival kapcsolatos kompetencia kifejlesztése során. Ezen túlmenően nem feltétlenül kell teljes körű vizsgálatot végrehajtani az új vizsgálati módszerek laboratóriumi kialakításának szakaszaiban, a szükséges készségek kifejlesztése során pedig kevesebb állatot vagy vizsgálati koncentrációt lehet alkalmazni.

Történeti kontrollokadatok

A jártassági vizsgálatok során a laboratóriumnak a releváns szövetek és fajok esetében a pozitív és negatív kontrollok történeti tartományának és eloszlásának megállapítását szolgáló történeti adatbázist kell kiépítenie. A történeti adatok összeállításának és felhasználásának módjára (azaz az adatok történeti adatokhoz számításának és azok közül való kizárásának kritériumaira, valamint egy adott kísérlet elfogadhatósági kritériumaira) vonatkozó ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (47). A különböző szövetek és a különböző fajok, továbbá a különböző vivőanyagok és beadási módok a negatív kontrollok esetében eltérő értékeket adhatnak a csóva DNS %-os arányára. Ezért fontos minden egyes szövet és faj esetében negatív kontrollokra vonatkozó tartományokat létrehozni. A laboratóriumoknak minőségellenőrzési módszereket, például ellenőrzési diagramokat (C-diagramokat vagy X-bar diagramokat (48)) kell alkalmazniuk annak meghatározására, hogy adataik mennyire változóak, valamint annak bizonyítására, hogy

▼M7

náluk a módszertan „ellenőrzés alatt” áll. Előfordulhat, hogy a megfelelő pozitív kontrollanyagokat, a dózistartományokat és a kísérleti körülményeket (például az elektroforézis feltételeit) is optimalizálni kell az elenyésző hatások kimutatásához (lásd a 17. pont).

A kísérleti protokoll bármely módosítását meg kell vizsgálni abból a szempontból, hogy összhangban van-e a laboratórium meglévő történeti kontrolladatbázisaival. Jelentősebb következetlenségek fennállása esetén új történeti kontrolladatbázist kell létrehozni.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Az állatfaj kiválasztása

Szokásosan egészséges, fiatal, ivarérett, általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó rágcsálókat kell alkalmazni (amelyeknek a kezelés kezdetén 6–10 hetesnek kell lenniük, bár valamivel idősebb állatok is elfogadhatóak). A rágcsálófaj kiválasztásának i. (az adatok viszonyíthatósága és az integrált vizsgálatok elvégezhetősége érdekében) az egyéb toxicitásvizsgálatokban használt fajokon, ii. (a karcinogenezis mechanizmusának vizsgálata során) a karcinogenitás-vizsgálatban tumort kifejlesztett fajokon, vagy iii. az emberek szempontjából leginkább releváns anyagcseréjű fajokon kell alapulnia, ha ismerek ilyen fajok. E vizsgálatban rendszerint patkányokat kell használni. Etikai és tudományosan indokolt esetben azonban más fajok is használhatók.

Az állatok tartásának és etetésének körülményei

Rágcsálók esetében a kísérleti helyiség hőmérsékletének ideális esetben 22 °C (±3 °C)-nak kell lennie. Ideális esetben a helyiség relatív páratartalmának 50–60 %-nak kell lennie, de legyen legalább 30 %, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgálati vegyi anyaggal való megfelelő keveredés szükségessége is befolyásolhatja, ha a vizsgálati vegyi anyag beadása ilyen módon történik. A rágcsálókat azonos ivarú rágcsálókból (általában legfeljebb öt egyedből) álló kis csoportokban kell elhelyezni, amennyiben nem várható agresszív viselkedés. Az állatok kizárólag tudományosan indokolt esetben tarthatók egyenként. Amennyiben lehetséges, szilárd aljzatot kell használni, mivel a rácspadló súlyos sérülést okozhat (49). Megfelelő környezetgazdagítást kell biztosítani.

Az állatok előkészítése

Az állatokat véletlenszerűen kell besorolni a kontroll- és kezelt csoportokba. Az egyes állatokat egyedi azonosítóval kell ellátni, és a kezelés megkezdése előtt legalább öt napig szoktatni kell a laboratóriumi körülményekhez. Az állatok azonosításához a legkevésbé invazív módszert kell alkalmazni. Megfelelő módszer a gyűrűzés, a címkézés, a mikrocsip beültetése vagy a biometrikus azonosítás. A fül vagy a lábujj kilyukasztása tudományosan nem indokolt ezekben a vizsgálatokban. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy a lehető legkisebb legyen a ketrec elhelyezéséből eredő esetleges hatás. A vizsgálat kezdetén az állatok tömege közötti eltérésnek minimálisnak kell lennie és nem haladhatja meg a ± 20 %-ot.

A dózisok előkészítése

Az állatoknak történő adagolás előtt a szilárd halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni kell megfelelő vivőanyagokban, vagy bele kell keverni a takarmányba vagy az ivóvízbe. A folyékony vizsgálati vegyi anyagok közvetlenül adagolhatók vagy az adagolás előtt hígíthatók. Belélegzéses expozíció esetén a vizsgálati vegyi anyagok fizikai-kémiai tulajdonságaiktól függően gáz, gőz vagy szilárd/folyadék aeroszol formában adagolhatók (50) (51).

▼M7

A vizsgálati vegyi anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve akkor, ha a stabilitási adatok bizonyítják a tárolás elfogadhatóságát és meghatározzák a megfelelő tárolási feltételeket.

Vizsgálati körülmények

Vivőanyag

A vivőanyag nem okozhat toxikus hatásokat az alkalmazott dózisok mellett, és nem alkalmazható olyan vivőanyag, amelyről feltehető, hogy kémiai reakcióba fog lépni a vizsgálati vegyi anyagokkal. Jól ismert oldószerektől eltérő vivőanyagok használata esetén azok használatát alá kell támasztani a kísérleti állatok, a beadási mód és a végpont tekintetében a kompatibilitásukat jelző referenciaadatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát ajánlatos megfontolni. Megjegyzendő, hogy egyes vivőanyagok (különösen a viszkózus vivőanyagok) gyulladást okozhatnak és az érintkezés helyén növelhetik a DNS-száltörések háttérszintjét, különösen többszöri beadás esetén.

Kontrollok

Pozitív kontrollok

Ez alkalommal legalább három, egy ivarhoz tartozó, vagy mindkét ivar használata esetén mindkét ivarhoz tartozó állatból álló (lásd a 32. pontot), pozitív kontrollal kezelt csoportot kell alkalmazni minden vizsgálatnál. Lehet, hogy a jövőben igazolható lesz, hogy a megfelelő jártassággal csökkenthető a pozitív kontrollok szükségessége. Több mintavételi időpont alkalmazása esetén (például egyetlen beadást tartalmazó protokollnál) elég az egyik mintavételi időpontban pozitív kontrollt alkalmazni, de biztosítani kell a kiegyensúlyozott kísérlettervezést (lásd a 48. pontot). A párhuzamos pozitív kontrollanyagokat nem szükséges a vizsgálati vegyi anyaggal azonos útvonalon adagolni, bár az érintkezés helyén kifejtett hatások mérésekor fontos ugyanannak az útvonalnak az alkalmazása. A pozitív kontrollanyagoknak igazoltan DNS-száltöréseket kell előidézniük a vizsgálati vegyi anyag szempontjából lényeges összes szövetben; a választott pozitív kontroll valószínűsíthetően az EMS, mivel az az összes vizsgált szövetben DNS-száltöréseket okoz. A pozitív kontrollanyagok dózisát úgy kell megválasztani, hogy mérsékelt hatást fejtsenek ki, lehetővé téve a vizsgálat teljesítőképességének és érzékenységének kritikus szempontú értékelését; e dózisok a laboratórium által a jártasság igazolása során készített dózis-válasz görbéken is alapulhatnak. A párhuzamos pozitív kontroll állataiban a csóva DNS %-os arányának összhangban kell lennie az adott faj egyes szövetei és az adott fajnál alkalmazott mintavételi időpont esetében előre meghatározott laboratóriumi tartománnyal (lásd a 16. pontot). A pozitív kontrollként szolgáló anyagokra és a hozzájuk tartozó (rágcsáló) célszövetekre az 1. táblázat tartalmaz példákat. Az 1. táblázatban megadottaktól eltérő anyagok tudományosan indokolt esetben választhatók.

1. táblázat

Példák a pozitív kontrollként szolgáló anyagokra és azok célszöveteire

Anyagok és CAS-számok
Etil-metánszulfonát (CAS-szám: 62-50-0) bármely szövet esetében
N-etil-N-nitrozo-karbamid (CAS-szám: 759-73-9) a máj, a gyomor, a patkóbél vagy az éhbél esetében
Metil-metánszulfonát (CAS-szám: 66-27-3) a máj, a gyomor, a patkóbél vagy az éhbél esetében, a tüdő- és bronchoalveoláris (BAL) mosással kinyert sejtek, a vese, a húgyhólyag, a tüdő, a here és a csontvelő/vér esetében
N-metil-*N′* -nitro-*N*-nitrozoguanidin (CAS-szám: 70-25-7) a gyomor, a patkóbél vagy az éhbél esetében
1,2-dimetil-hidrazin 2-hidroklorid (CAS-szám: 306-37-6) a máj és a zsigerek esetében
N-metil-*N*-nitrozo-karbamid (CAS-szám: 684-93-5) a máj, a csontvelő, a vér, a vese, a gyomor, az éhbél és az agy esetében.

▼M7

Negatív kontrollok

Az egyes vizsgálatokban minden mintavételi időpont és szövet esetében csak vivőanyaggal és egyébiránt a kezelt csoportokéval megegyező módon kezelt negatív kontrollállat-csoportot kell használni. A negatív kontroll állataiban lévő csóva DNS %-os arányának az adott faj egyes szövetei és az adott fajnál alkalmazott mintavételi időpont esetében előre meghatározott laboratóriumi háttértartományban kell lennie (lásd a 16. pontot). Ha a kontrollokra vonatkozóan nem állnak rendelkezésre olyan történeti vagy közzétett adatok, amelyek igazolják, hogy a választott vivőanyag, a beadások száma vagy a beadási mód nem idéz elő ártalmas vagy genotoxikus hatásokat, a vivőanyag-kontroll elfogadhatóságának megállapítása érdekében a teljes vizsgálat lebonyolítása előtt kiindulási vizsgálatot kell végezni.

ELJÁRÁS

Az állatok száma és ivara

Bár kevés adat létezik olyan nőivarú állatokra vonatkozóan, amelyek alapján ivarok közötti összehasonlítást lehetne végezni az üstökösvizsgálattal kapcsolatban, az egyéb *in vivo* genotoxicitási válaszok általában hasonlóak a hím- és a nőivarú állatok között, ezért a vizsgálatok többsége mindkét ivarnál elvégezhető. A hímek és a nőstények közötti lényeges eltéréseket (például a szisztémás toxicitás, a metabolizmus, a biológiai hasznosíthatóság stb. például többek között dózisbehatároló vizsgálattal megállapított eltéréseit) bizonyító adatok mindkét ivar használatát ösztönzik. Ebben az esetben helyénvaló lehet mindkét ivarnál vizsgálatot végezni, például ismételt dózisú toxicitási vizsgálat keretében. Mindkét ivar használata esetén helyénvaló lehet a faktoriális kísérlettervezés alkalmazása. Az e kísérlettervezés segítségével végzendő adatelemzés részletei a 2. függelékben találhatók.

A vizsgálat megkezdésekor (és a jártasság megállapítása során) a csoportok méretét úgy kell megállapítani, hogy csoportonként legalább öt azonos ivarú – illetve mindkét ivar használata esetén mindkét ivarból öt – (a párhuzamos pozitív kontrollcsoportban kevesebb; lásd a 29. pontot) elemezhető állat legyen. Amennyiben a vegyi anyagoknak való emberi expozíció szexspecifikus lehet, mint például egyes gyógyszerek esetében, a vizsgálatot a megfelelő ivarú állatokkal kell elvégezni. Útmutatás a tipikus állatok maximális számára vonatkozó követelményhez: a 33. pontban megállapított paraméterek szerint, három dóziscsoporttal, valamint párhuzamos negatív és pozitív kontrollcsoportokkal (melyek mindegyike öt, egy ivarhoz tartozó állatból áll) végzett vizsgálathoz 25–35 állatra lenne szükség.

A KEZELÉS ÜTEMTERVE

Az állatokat legalább két napon át napi rendszerességgel kezelni kell (azaz az állatokat kb. 24 órás időközönként két vagy több alkalommal kell kezelni), és a mintákat az utolsó kezelést követő 2–6 órában (vagy a T_{max} időpontban) kell begyűjteni (12). A hosszabb ideig tartó adagolási rendből (például 28 napos napi adagolásból) származó minták elfogadhatóak. Bizonyítást nyert, hogy az üstökösvizsgálat és az eritrocita mikronukleusz-vizsgálat sikeresen ötvözhető (10) (19). Az üstökösvizsgálat céljából történő szövetmintavétel lebonyolítását, valamint a más típusú toxikológiai vizsgálatokhoz végzett szövetmintavétel követelményeit azonban alaposan figyelembe kell venni. Az utolsó dózist követő 24 óra elteltével végzett mintagyűjtés, amely az általános toxicitásvizsgálatok esetében jellemző, a legtöbb esetben nem megfelelő (lásd a mintavétel időpontjáról szóló 40. pontot). Más kezelési és mintavételi ütemtervek alkalmazását meg kell indokolni (lásd a 3. függeléket). Alkalmazható például egyetlen kezelés és több mintavétel, azonban megjegyzendő, hogy az egyetlen beadással végzett vizsgálathoz a több mintavételi időpont szükségessége miatt több állatra van szükség, de alkalmanként ez előnyben részesíthető, például akkor, ha a vizsgálati vegyi anyag a megismételt beadását követően túlzott toxicitást idéz elő.

▼M7

A vizsgálat végrehajtásának módjától függetlenül a vizsgálat elfogadható, amennyiben a vizsgálati vegyi anyag pozitív választ vált ki, illetve negatív vizsgálat esetében, amennyiben igazolást nyert a célszövet(ek) expozícióját vagy a célszövet(ek)re kifejtett toxikus hatást közvetlen vagy közvetett módon alátámasztó bizonyíték, vagy a határdózis elérése esetén (lásd a 36. pont).

A vizsgálati vegyi anyagok több dózisra osztva is beadhatók, például nagy mennyiségű anyag beadásának megkönnyítése érdekében ugyanazon a napon két, legfeljebb 2–3 órás időközönként végzett kezeléssel. Ilyen körülmények között a mintavételi időpontokat az utolsó adagolás időpontja alapján kell ütemezni (lásd a 40. pontot).

Dózisszintek

Ha előzetes dózisbehatároló vizsgálatra kerül sor amiatt, hogy más, releváns vizsgálatokból nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok a dózisok kiválasztásának segítéséhez, azt ugyanazon laboratóriumban, ugyanazon fajok, törzsek, ivarok és kezelési eljárások alkalmazásával kell végrehajtani, mint amelyek a fő vizsgálatban alkalmazandóak, a dózisbehatároló vizsgálat végrehajtására vonatkozó aktuális megközelítések szerint. A vizsgálatnak a maximális tolerálható dózis (MTD) meghatározására kell irányulnia, amely a vizsgálati időszak hosszához képest enyhe toxikus hatásokat kiváltó dózis (például egyértelmű klinikai tüneteket, köztük rendellenes viselkedést vagy reakciókat, enyhe testtömeg-csökkenést vagy a célszövetben citotoxicitást vált ki), de amely elhullást, illetve eutanáziát igénylő, bizonyított fájdalmat, szenvedést vagy szorongást nem idéz elő. Legalább 14 napig adagolt, nem toxikus vizsgálati vegyi anyag esetén a maximális dózis (határdózis) 1 000 mg/testtömeg kg/nap. 14 napnál rövidebb beadási időszak esetén a maximális dózis (határdózis) 2 000 mg/testtömeg kg/nap. Ezek a határértékek a vizsgálati vegyi anyagok bizonyos, külön szabályozás hatálya alá tartozó típusai (például a humán gyógyszerek) esetében változóak lehetnek.

Azok a vegyi anyagok, amelyek a toxikokinetikai tulajdonságok telítődését mutatják, vagy olyan detoxifikációs folyamatokat idéznek elő, amelyek hosszú távú beadás után az expozíció csökkenéséhez vezethetnek, kivételek lehetnek a dózisbeállítási kritériumok alól, és azokat eseti alapon kell értékelni.

Az üstökösvizsgálat akut és szubakut változata esetében egyaránt a maximális dózis (MTD, maximális megvalósítható dózis, maximális expozíciós dózis vagy határdózis) mellett az egyes mintavételi időpontok esetében a dózissal összefüggő válaszok bizonyításához legalább két további, megfelelően elosztott (lehetőleg kevesebb mint 10 hányadosú) dózisszint csökkenő sorozatát kell kiválasztani. Az alkalmazott dózisszinteknek ugyanakkor lehetőleg át kell fogniuk a maximálistól a már csak kissé vagy egyáltalán nem toxikusig terjedő tartományt is. Ha a célszövet toxicitása valamennyi vizsgált dózisszintnél megfigyelhető, érdemes nem toxikus dózisoknál további vizsgálatot végezni (lásd az 54–55. pontot). A dózis-válasz görbe alakjának teljesebb körű jellemzését célzó vizsgálatok további dóziscsoporto(ka)t tehetnek szükségessé.

A dózisok beadása

Az emberi expozíció várható útját figyelembe kell venni a vizsgálat tervezése során. Ezért az egyéb expozíciós utak (például takarmány, ivóvíz, helyi szubkután, intravénás, orális (gyomorszondával), inhalációs, intratracheális vagy implantáció) is kiválaszthatók indokoltként. Az utat mindenesetre úgy kell kiválasztani, hogy biztosítsa a célszövet(ek) megfelelő expozícióját. A hasüregbe adott injekció általában nem ajánlott, mivel az nem jellemző emberi expozíciós út, és kizárólag tudományos indokolással alkalmazható (például vizsgálati célra alkalmazott egyes pozitív kontrollanyagok vagy bizonyos, hasüregbe adott gyógyszerek esetében). A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható

▼M7

maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata nem haladhatja meg a 1 ml/100 testtömeggramm mennyiséget, kivéve vizes oldatok esetén, amelyeknél legfeljebb 2 ml/100 testtömeggramm használható. Ennél nagyobb mennyiségek használatát (ha az állatjóléti tárgyú jogszabályok lehetővé teszik) meg kell indokolni. Amennyiben lehetséges, a különböző dózisszinteket az adagolt készítmény koncentrációjának kiigazításával kell elérni, hogy valamennyi dózisszintnél a testtömeghez képest állandó térfogatot lehessen biztosítani.

Mintavételi időpont

A mintavételi időpont kritikus változó, ugyanis az az időszak határozza meg, amely ahhoz szükséges, hogy a vizsgálati vegyi anyagok maximális koncentrációt érjenek el a célszövetben, valamint ahhoz, hogy DNS-száltörések következzenek be, de még mielőtt ezek a törések megszűnnek, reparálódnak vagy sejthalálhoz vezetnek. Az üstökösvizsgálattal kimutatott egyes, DNS-száltörésekhez vezető léziók fennállása nagyon rövid lehet, legalább is egyes, *in vitro* körülmények között vizsgált vegyi anyagok esetében (52) (53). Ennek megfelelően, amennyiben feltehető, hogy átmeneti DNS-károsodások alakulnak ki, intézkedéseket kell tenni az eltűnésük mérséklése érdekében, mégpedig annak biztosításával, hogy a szövetmintavételre kellően korán, lehetőleg az alább megadott, alapértelmezett időpontok előtt kerüljön sor. Az optimális mintavételi időpont(ok) a vegyi anyagra vagy a beadási módra jellemző(ek) lehet(nek), ami például a szövet intravénás beadással történő vagy belélegzéses expozíciója esetén gyors expozíciót eredményez. Ennek megfelelően a mintavételi időpontokat kinetikus adatok alapján kell meghatározni, ha rendelkezésre állnak ilyen adatok (például T_{max} időpontban, a plazmán vagy a szöveten belüli csúcskoncentráció (C_{max}) elérésekor, vagy többszöri beadás esetén állandósult állapotban). Kinetikus adatok hiányában a genotoxicitás mérésére megfelelő kompromisszumot jelent két vagy több kezelés esetén az utolsó kezelést követő 2–6 órán belüli mintavétel, illetve egyszeri beadást követően 2–6 órán belüli és 16–26 órán belüli mintavétel, bár ügyelni kell arra, hogy az utolsó (vagy egyetlen) dózist követően minden állat boncolása egyszerre történjen. A célszervekben kiváltott toxikus hatások megjelenésére vonatkozó adatok (ha rendelkezésre állnak) szintén felhasználhatók a megfelelő mintavételi időpontok kiválasztásához.

Megfigyelések

Naponta legalább egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban az állatok egészségére vonatkozó, általános klinikai megfigyelést kell végezni és azt dokumentálni kell, figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát (54). Naponta legalább kétszer meg kell vizsgálni az összes állatot megbetegedés és elhullás szempontjából. Hosszabb időtartamú vizsgálatok esetén az állatokat legalább hetente egyszer, valamint a vizsgálati időszak befejeződésekor le kell mérni. A felvett táplálékot a takarmány megváltoztatásakor és legalább heti rendszerességgel le kell mérni. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag beadására az ivóvízzel együtt kerül sor, a vízfogyasztást minden vízcsere alkalmával és legalább hetente le kell mérni. A túlzott toxicitás nem halálos jeleit mutató állatokon a vizsgálati időszak befejeződése előtt eutanáziát kell végrehajtani, és azok általában nem használhatóak üstökösvizsgálathoz.

A szövetek gyűjtése

Mivel a DNS-száltörések (üstökösök) indukcióját gyakorlatilag bármilyen szövetben tanulmányozni lehet, a begyűjtendő szövet(ek) kiválasztását egyértelműen meg kell indokolni, és azt a vizsgálat lefolytatásának okára, illetve a vizsgálati vegyi anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló ADME-, genotoxicitási, karcinogenitási és más toxicitási adatokra kell alapozni. A megfontolandó lényeges tényezők közé kell tartoznia a vizsgálati vegyi anyagok beadási útjának (a valószínű emberi expozíciós útra/utakra alapozva), becsült szöveti megoszlásának és felszívódásának, anyagcseréje szerepének, valamint a lehetséges hatásmechanizmusának. A leggyakrabban vizsgált szövet a máj, és a májra vonatkozóan áll rendelkezésre a legtöbb adat. Ezért háttérinformációk hiányában, és amennyiben nem kerül sor konkrét célszövetek azonosítására, a májból történő

▼M7

mintavétel indokolt, mivel ez a xenobiotikus anyagcsere elsődleges helye, és gyakran ki van téve a kiindulási anyag(ok)nak és metabolitjának (azok metabolitjainak). Egyes esetekben relevánsabb lehet az érintkezés helyének vizsgálata (orálisan adagolt vegyi anyagok esetében például a mirigyes gyomor vagy a patkóbél/éhbél vizsgálata, vagy belélegzett vegyi anyagok esetében a tüdő vizsgálata). A vizsgálat konkrét céljai alapján további vagy más szöveteket kell kiválasztani, de hasznos lehet ugyanazon állatok több szövetének vizsgálata, amennyiben a laboratórium igazolta az adott szövetek terén szerzett jártasságát és több szövet egyidejű kezelése terén szerzett szakértelmét.

Minták elkészítése

A következő (44–49.) pontokban ismertetett eljárások esetében fontos, hogy minden oldatot, illetve stabil szuszpenziót a lejárati idejükön belül fel kell használni, vagy szükség esetén azokat frissen kell elkészíteni. A következő bekezdésekben az is szerepel, hogy i. az egyes szövetek boncolás utáni eltávolításához, ii. az egyes szövetek sejtszuszpenziókban/sejtmagszuszpenziókban történő feldolgozásához, valamint iii. a szuszpenzió feldolgozásához és a tárgylemezek preparálásához igénybe vett idő egyaránt kritikus változónak minősül (a fogalommeghatározásokat lásd az 1. függelékben), és az e műveletszakaszoknál elfogadható időtartamot a módszer kialakítása és a jártasság igazolása során kell meghatározni.

Az állatokon a hatályos állatjóléti jogszabályokkal és a 3R elvével összhangban a vizsgálati vegyi anyaggal végzett utolsó kezelés utáni megfelelő időpont(ok)ban eutanáziát kell végrehajtani. A kiválasztott szövet(ek)et el kell távolítani, fel kell boncolni, egy részét (részüket) pedig az üstökösvizsgálat céljára kell begyűjteni, ugyanakkor a szövet ugyanazon részéből származó metszetet kell kivágni és azt formaldehid-oldatba vagy hasonló fixálószerbe kell helyezni egy standard módszerek (12) szerint végzendő, esetleges kórszövettani elemzés céljából (lásd az 55. pontot). Az üstökösvizsgálat céljára szánt szövetet zúzópufferbe kell helyezni, a maradék vér eltávolítása érdekében megfelelően át kell öblíteni hideg zúzópufferrel, és a feldolgozásig jéghideg zúzópufferben kell tárolni. *In situ* perfúziót is lehet végezni, például a máj, a vese esetében.

A sejtizolálásra/sejtmag-izolálásra vonatkozóan számos közzétett módszer létezik. Ilyen többek között a szövetek – például a máj és a vese – összezúzása, a nyálkahártya felületének kaparása a gyomor-bél traktus esetében, a homogenizálás és az enzimatikus emésztés. A JaCVAM validálási kísérlete csak izolált sejteket vizsgált, ezért annak érdekében, hogy a módszer kialakításánál, valamint a jártasság igazolásánál a JaCVAM kísérleti adataira lehessen hivatkozni, az izolált sejtek részesítendők előnyben. Kiderült azonban, hogy izolált sejtek vagy nem izolált sejtek használata esetén nincs lényeges különbség a vizsgálati eredmények között (8). A sejtek/sejtmagok izolálására szolgáló különböző módszerek (például homogenizálás, zúzás, enzimatikus emésztés és hálóval végzett szűrés) is hasonló eredményeket adtak (55). Következésképp izolált sejtek vagy izolált sejtmagok is felhasználhatók. A laboratóriumoknak alaposan értékelniük és validálniuk kell a különálló sejtek/sejtmagok izolálására szolgáló szövetspecifikus módszereket. A 40. pontban foglaltaknak megfelelően az üstökösvizsgálattal kimutatott DNS-száltörésekhez vezető bizonyos léziók fennállása igen rövid lehet (52) (53). Ezért az egysejtes szuszpenziók vagy a sejtmagszuszpenziók elkészítéséhez alkalmazott módszertől függetlenül fontos, hogy a szövetek feldolgozására az állatok leölését követő lehető legrövidebb időn belül sor kerüljön, és azok olyan körülmények közé kerüljenek, amelyek visszafogják a léziók megszűnését (például a szövet alacsony hőmérsékleten tartásával). A sejtszuszpenziókat – mindaddig, amíg nem használatra készek – jéghideg hőmérsékleten kell tárolni annak érdekében, hogy a minták közötti minimális eltérést, valamint a pozitív és a negatív kontrollok megfelelő válaszát lehessen demonstrálni.

▼M7

TÁRGYLEMEZEK PREPARÁLÁSA

A tárgylemez-preparálást az egysejtes szuszpenziók vagy a sejtmagszuszpenziók elkészítése után a lehető legrövidebb időn belül (ideális esetben egy órán belül) el kell végezni, az állat elpusztulása és a tárgylemez-preparálás közötti hőmérsékletet és időt azonban szigorúan ellenőrizni és validálni kell a laboratóriumi körülmények között. Az alacsony olvadáspontú agarózhoz a tárgylemezek elkészítése érdekében adott sejtszuszpenzió mennyisége (általában 0,5–1,0 %) nem csökkentheti az alacsony olvadáspontú agaróz százalékos arányát 0,45 % alá. Az optimális sejtszámot az üstökösök számlálásához használt képelemző rendszer határozza meg.

Lízis

A lízis feltételei szintén kritikus változót jelentenek, és zavarhatják a DNS-módosulás konkrét típusaiból (egyes DNS-alkilációkból és DNS-bázisok melléktermékeiből) fakadó száltöréseket. Ezért a lízis feltételeit az egyes kísérleteken belüli összes tárgylemez esetében a lehető legállandóbban kell tartani. A preparálást követően a tárgylemezeket lehűtött lizáló oldatba kell helyezni legalább egy órára (vagy egy éjszakára), kb. 2–8 °C-os hőmérsékleten, tompított fényviszonyok mellett, az esetlegesen UV-komponenseket tartalmazó fehér fényt kiiktató például sárga fényre (vagy fénytől védett közegbe). Ezen inkubációs időszakot követően, még a lúgos közegben végbemenő kitekeredés előtt a tárgylemezeket a maradék detergens és só eltávolítása érdekében át kell öblíteni. Az öblítés végezhető tisztított vízzel, semlegesítő pufferrel vagy foszfátpufferrel. Elektroforézis-puffer is használható. Ezáltal fennmarad a lúgos közeg az elektroforézis-kamrában.

Kitekeredés és elektroforézis

A tárgylemezeket véletlenszerűen kell elhelyezni a merülő típusú elektroforézis-egység platformján, amelynek elegendő elekroforézis-oldatot kell tartalmaznia ahhoz, hogy a tárgylemezek felületét teljesen elfedje (az elmerítés mélységének is következetesnek kell lennie az egyes vizsgálatmenetekben). Egy másik típusú üstökösvizsgálatban például az aktív hűtésű, keringtetésű és nagyfeszültségű áramellátású elektroforézis-egységeknél magasabb az oldat rétege, ezáltal nagyobb lesz az elektromos áram erőssége, míg a feszültség állandó marad. A minták elektroforézis-tartályba helyezéséhez kiegyensúlyozott kísérlettervezést kell alkalmazni, hogy mérséklődjenek a tartályon belüli esetleges trendhatások vagy peremhatások és minimálisra csökkenjen az egyes tételek közötti variabilitás, azaz az egyes elektroforézis-vizsgálatmenetekben a vizsgált állatokból ugyanakkora számú tárgylemezt, valamint a különböző dóziscsoportokból, negatív és pozitív kontrollokból származó mintákat kell felhasználni. A tárgylemezeket legalább 20 percig állni kell hagyni, hogy a DNS kitekeredjen, ezt követően pedig a vizsgálat érzékenységét és dinamikus tartományát maximalizáló (azaz az érzékenység maximalizálása érdekében a negatív és a pozitív kontrolloknál a csóva DNS elfogadható %-os arányát eredményező), szabályozott körülmények között elektroforézisnek kell alávetni. A DNS-vándorlás mértéke lineárisan összefügg az elektroforézis időtartamával, valamint a potenciállal (V/cm) is. A JaCVAM kísérlete alapján legalább 20 percre vonatkoztatva ez 0,7 V/cm lehet. Az elektroforézis időtartama kritikus változónak minősül, és az elektroforézis idejét úgy kell beállítani, hogy optimális legyen a dinamikus tartomány. A hosszabb ideig (például az érzékenység maximalizálása érdekében 30 vagy 40 percig) tartó elektroforézis következtében rendszerint erősebb pozitív válaszok alakulnak ki az ismert mutagénekkel. A hosszabb ideig tartó elektroforézis azonban túlzott vándorlást is előidézhet a kontrollmintákban. Az egyes vizsgálatokban a feszültséget állandó szinten kell tartani, a többi paraméter variabilitásának pedig szűk és meghatározott tartományban kell lennie, a JaCVAM kísérletében például a 0,7 V/m 300 mA kezdeti áramerősséget eredményezett. Az

▼M7

előírt feltételek elérése és a kísérlet alatti fenntartása érdekében a puffer mélységét ki kell igazítani. Az elekroforézis kezdetén és végén mért áramerősséget rögzíteni kell. Ezért az egyes vizsgált szövetek tekintetében érintett laboratóriumok jártasságának első alkalommal történő igazolásakor meg kell határozni az optimális feltételeket. Az elektroforézis-oldat hőmérsékletét a kitekeredés és az elektroforézis során alacsony szinten, rendszerint 2–10 °C-on kell tartani (10). Az elektroforézis-oldatnak a kitekeredés kezdetén, az elektroforézis kezdetén és az elektroforézis végén mért hőmérsékletét rögzíteni kell.

Az elektroforézis befejezését követően a tárgylemezeket legalább 5 percig a semlegesítő pufferbe kell meríteni, illetve azzal át kell öblíteni. A gélek „friss” állapotban (azaz 1–2 napon belül) megfesthetők és kiértékelhetők, vagy későbbi kiértékelés céljából (azaz a megfestést követő 1–2 héten belül) dehidratálhatók (56). A feltételeket azonban a jártasság igazolása során kell validálni, és e feltételek mindegyike vonatkozásában történeti adatokat kell előállítani, amelyeket külön-külön kell tárolni. Az utóbbi esetben a tárgylemezeket legalább 5 percen keresztül, abszolút etanolba merítéssel kell dehidratálni, hagyni kell a levegőn megszáradni, majd a kiértékelésig szobahőmérsékleten vagy hűtőben tartott edényben kell tárolni.

Mérési módszerek

Az üstökösökről automatizált vagy félig automatizált képelemző rendszer segítségével kvantitatív értékelést kell készíteni. A tárgylemezeket megfelelő fluoreszcens festékkel (például SYBR Gold, Green I, propídium-jodid vagy etídium-bromid) meg kell festeni, és megfelelő (például 200-szoros) nagyításnál meg kell figyelni megfelelő detektorokkal vagy digitális (például CCD-) kamerával felszerelt epifluoreszcens mikroszkóppal.

A sejtek az üstökösképek atlaszában (57) ismertetett három kategóriába sorolhatók: értékelhető, nem értékelhető és „fantomsejt” (a további magyarázatot lásd az 56. pontban). A mesterségesen előidézett változások elkerülése érdekében a csóva DNS százalékos aránya szempontjából csak az (egyértelműen meghatározott maggal és csóvával rendelkező, a szomszédos sejtekkel kölcsönhatásba nem lépő) értékelhető sejteket kell értékelni. A nem értékelhető sejtek gyakoriságát nem kell dokumentálni. A fantomsejtek gyakoriságát mintánként legalább 150 sejt (további részletekért lásd az 56. pontot) vizuális értékelése alapján kell meghatározni (mivel az egyértelműen meghatározott mag hiánya azt jelenti, hogy nem mutathatók ki könnyen képelemzéssel), valamint külön-külön kell dokumentálni.

Minden elemzendő tárgylemezt, a pozitív és negatív kontrollokét is ideértve, önálló kódolással kell ellátni és „vakon” kell értékelni, hogy az értékelést végző személy ne ismerje a kezelés körülményeit. Minden egyes minta (szövetenként és állatonként vett minta) esetében legalább 150 sejtet kell elemezni (a fantomsejtek kivételével – lásd az 56. pontot). Dózisonként legalább öt állat (a párhuzamos pozitív kontrollban kevesebb állat – lásd a 29. pontot) esetében állatonként 150 sejt értékelése Smith és társai 2008-as elemzése (5) szerint megfelelő statisztikai erőt biztosít. Tárgylemezek használata esetén ez csoportonként öt állatból álló mintánál mintánként 2–3 értékelt tárgylemezt jelent. A tárgylemez több területén kell megfigyelést végezni olyan sűrűség mellett, amely biztosítja, hogy a csóvák ne legyenek átfedésben. A tárgylemezek peremén végzett értékelés kerülendő.

Az üstökösvizsgálatban a DNS-száltörések független végpontokkal mérhetők, ilyen a csóva DNS %-os aránya, a csóvahossz és a csóva létrejöttének pillanata. Megfelelő képelemző szoftver használata esetén mindhárom mérés elvégezhető. A csóva DNS %-os aránya (más néven: a csóva %-os intenzitása) azonban ajánlott az eredmények értékeléséhez és értelmezéséhez (12) (40) (41) (42), és (a sejtek teljes intenzitásának százalékos arányában kifejezett) a csóvában lévő DNS-fragmens intenzitása határozza meg (13).

▼M7

Szövetkárosodás és citotoxicitás

Az üstökösvizsgálat pozitív megállapításai nem feltétlenül kizárólag a genotoxicitásnak tulajdoníthatók, a célszövet toxiticitása is fokozhatja a DNS-vándorlást (12) (41). Ezzel ellentétben az ismert genotoxikus anyagok esetében gyakran megfigyelhető alacsony vagy mérsékelt citotoxicitás (12), ami arra utal, hogy kizárólag üstökösvizsgálatban nem lehet megkülönböztetni a genotoxicitás által előidézett DNS-vándorlást a citotoxicitás által előidézett DNS-vándorlástól. A DNS-vándorlás fokozódásának megfigyelése esetén azonban ajánlott megvizsgálni egy vagy több citotoxicitás-mutatót, ugyanis ez segíthet a megállapítások értelmezésében. A citotoxicitás egyértelmű bizonyítékának fennállása esetén fokozódó DNS-vándorlást óvatosan kell értelmezni.

Számos citotoxicitás-mérésre született javaslat, és ezek közül a kórszövettani elváltozások a szövetekre kifejtett toxicitás releváns kritériumának tekintendők. Többek között a gyulladásra, a sejtbeszűrődésre, az apoptotikus vagy a nekrotikus elváltozásokra vonatkozó megfigyeléseket összefüggésbe hozták a DNS-vándorlás fokozódásával, azonban ahogyan azt a JaCVAM validálási kísérlete (12) bebizonyítja, a DNS-vándorlás fokozódásával mindig összefüggő kórszövettani elváltozások végleges jegyzéke nem áll rendelkezésre. A klinikai kémiai változások (például AST, ALT) szintén szolgálhatnak a szövetkárosodásra vonatkozó hasznos információkkal, és figyelembe vehetők további mutatók is, mint a kaszpáz-aktiválás, a TUNEL-festés, az Anexin V-festés stb. Mindemellett kevés közzétett adat van e mutatók *in vivo* vizsgálatokhoz történő felhasználására vonatkozóan, és egyes mutatók nem annyira megbízhatóak, mint mások.

A fantomsejtek olyan sejtek, amelyek mikroszkopikus képe kisméretű vagy hiányzó magból és nagyméretű, kiterjedt csóvából áll, továbbá súlyosan károsodott sejteknek minősülnek, bár az etiológiájuk bizonytalan (lásd a 3. függeléket). A csóva DNS %-os arányának képelemzéssel végzett mérése a csóva külső megjelenése miatt megbízhatatlan, ezért a fantomsejteket külön kell értékelni. A fantomsejtek előfordulását fel kell jegyezni és jelentésbe kell foglalni, és a vélhetően a vizsgálati vegyi anyagnak tulajdonítható, releváns növekedést óvatosan kell megvizsgálni és értelmezni. A vizsgálati vegyi anyagok potenciális hatásmechanizmusának ismerete segítséget nyújt ezekhez a megfontolásokhoz.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények feldolgozása

Az állat a kísérleti egység, ezért mind az egyes állatokra vonatkozó adatokat, mind az összefoglalt eredményeket meg kell jeleníteni táblázatos formában. Az adatok hierarchikus jellege miatt a csóva DNS %-os arányának mediánját ajánlott minden egyes tárgylemez esetében meghatározni, és minden egyes állat esetében ajánlott kiszámítani a mediánértékek átlagát (12). Ezt követően az egyes állatokra vonatkozó átlagértékek átlagát kell meghatározni a csoportra vonatkozó átlag kiszámításához. Mindezeket az értékeket bele kell foglalni a jelentésbe. Tudományos és statisztikai szempontból indokolt esetben más megközelítések is alkalmazhatók (lásd az 53. pont). Statisztikai elemzés különféle megközelítések alapján végezhető (58) (59) (60) (61). Az alkalmazandó statisztikai módszerek kiválasztásakor a fenti hivatkozásokban tárgyalt módon mérlegelni kell, hogy kell-e transzformálni az adatokat (például logaritmusra vagy négyzetgyökre) vagy az összes értékhez (még a nullától különböző értékekhez is) hozzá kell-e adni egy alacsony számot (például 0,001-et) a sejtek nulla értéke által kifejtett hatások mérséklése érdekében. Mindkét ivar használata esetén a kezelés és az ivar közötti kölcsönhatás elemzésének részletezése, valamint a megállapított eltérések meglététől vagy elmaradásától függően végzett későbbi adatelemzés a 2. függelékben található. A toxicitásra és a klinikai tünetekre vonatkozó adatokat szintén jelentésbe kell foglalni.

Elfogadhatósági kritériumok

Egy-egy vizsgálat elfogadása az alábbi kritériumokon alapul:

a. A párhuzamos negatív kontroll a 16. pont szerint belefoglalható a laboratórium negatív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisába.

▼M7

b. A párhuzamos pozitív kontrolloknak (lásd a 29. pontot) a pozitív kontrollokat tartalmazó történeti adatbázisban generált válaszokkal összeegyeztethető válaszokat, valamint a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva statisztikailag szignifikáns növekedést kell előidézniük.

c. Megfelelő számú sejt és dózis képezte elemzés tárgyát (52. és 36–38. pont).

d. A legmagasabb dózis kiválasztására vonatkozó kritériumok összhangban vannak a 36. pontban ismertetett kritériumokkal.

Az eredmények értékelése és értelmezése

Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha:

a. legalább az egyik vizsgálati dózis statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,

b. a megfelelő trendpróbával történő értékelés arra utal, hogy a növekedés a dózissal összefügg,

c. az adott faj, vivőanyag, beadási mód, szövet és beadások adott száma vonatkozásában ezen eredmények bármelyike a történeti negatív kontrolladatok eloszlásán kívül esik.

Mindezen kritériumok teljesülése esetén úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag DNS-száltöréseket képes előidézni az ebben a vizsgálati rendszerben tanulmányozott szövetekben. Ha e kritériumok közül csak egy vagy kettő teljesül, lásd a 62. pontot.

Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha:

a. a vizsgálati koncentrációk egyike sem mutat statisztikailag szignifikáns növekedést a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,

b. a megfelelő trendpróbával végzett értékelés nem mutat koncentrációval összefüggő növekedést,

c. az adott faj, vivőanyag, beadási mód, szövet és beadások adott száma vonatkozásában ezen eredmények mindegyike a történeti negatív kontrolladatok eloszlásán belül található,

d. a célszövet(ek) expozícióját vagy toxicitását alátámasztó közvetlen vagy közvetett bizonyíték igazolást nyert.

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag az e vizsgálati rendszerben tanulmányozott szövetekben nem képes DNS-száltörést előidézni.

Az egyértelműen pozitív vagy negatív válasz igazolása nem követelmény.

Amennyiben a válasz nem egyértelműen negatív és nem is egyértelműen pozitív (azaz az 59. és a 60. pontban felsorolt kritériumok mindegyike nem teljesül), illetve egy adott eredmény biológiai relevanciája megállapításának segítése érdekében az adatokat szakértői véleménnyel és/vagy további vizsgálatokkal kell értékelni, ha ez tudományosan indokolt. Hasznos lehet további sejtek értékelése (adott esetben) vagy megismételt kísérlet lehetőleg optimalizált kísérleti körülmények (például dózisok távolsága, más beadási módok, eltérő mintavételi időpontok vagy más szövetek alkalmazása) melletti elvégzése.

Ritka esetekben, még további vizsgálatok után is, az adatkészlet eleve kizárja a pozitív vagy negatív eredményekre vonatkozó következtetést, ezért kétértelmű reakció lesz a következtetés.

▼M7

A pozitív vagy kétértelmű eredmény biológiai relevanciájának értékeléséhez szükség van a célszövetben kifejtett citotoxicitásra vonatkozó információkra (lásd az 54–55. pontot). Ha pozitív vagy kétértelmű megállapítások kizárólag a citotoxicitásra utaló egyértelmű bizonyíték fennállása esetén figyelhetők meg, arra kell következtetni, hogy a vizsgálat a genotoxicitás szempontjából kétértelmű, kivéve, ha rendelkezésre áll elegendő olyan információ, amely alátámasztja a végleges következtetést. A vizsgálat negatív kimenetele esetében, amennyiben minden vizsgált dózisnál toxicitásra utaló jelek vannak, érdemes lehet nem toxikus dózisoknál további vizsgálatot végezni.

Vizsgálati jegyzőkönyv

A Vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

— eredet és rendelkezésre állás esetén a tételszám;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, felhasználási határideje vagy ismételt elemzésének napja, ha ismert.

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-név, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonossága stb.

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai jellemzik.

Oldószer/vivőanyag:

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indoklása;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert;

— a dóziskészítmények elkészítése;

— a készítmények analitikai meghatározásai (pl. stabilitás, homogenitás, névleges koncentráció).

Kísérleti állatok:

— a felhasznált faj/törzs, valamint megválasztásuk tudományos és etikai szempontú indokolása;

— az állatok száma, kora és ivara;

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány, környezetgazdagítás stb.;

— az állatok tömege a vizsgálat kezdetén és végén, az egyes csoportok esetében a testtömegtartományt, az átlagot és a szórást is ideértve.

Vizsgálati körülmények:

— a pozitív és negatív (vivőanyagos/oldószeres) kontrollok adatai;

▼M7

— a dózisbehatároló vizsgálat eredményei (ha történt ilyen vizsgálat);

— a dózisszintek kiválasztásának indoklása;

— a vizsgálati vegyi anyag előkészítésére vonatkozó részletek;

— a vizsgálati vegyi anyag beadására vonatkozó részletek;

— a beadási mód indoklása,

— befecskendezés helye (szubkután vagy intravénás vizsgálatoknál);

— a minták preparálásának módszerei, illetve ha rendelkezésre állnak, a kórszövettani elemzések, különösen a pozitív üstökösválaszt adó vegyi anyag esetén;

— a szövet megválasztásának indoklása;

— negatív eredmény esetén annak ellenőrzésére szolgáló módszerek, hogy a vizsgálati vegyi anyag elérte-e a célszövetet vagy az általános keringési rendszert;

— tényleges dózis (mg/testtömeg kg/nap) a vizsgálati vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjából (ppm) és a fogyasztásból számítva, ha alkalmazható;

— a takarmány és a víz minőségére vonatkozó adatok;

— a kezelési és mintavételi ütemtervek részletes leírása és kiválasztásuk indoklása (például toxikokinetikus adatok, amennyiben rendelkezésre állnak);

— a fájdalomcsillapítás, analgézia módja;

— az eutanázia módja;

— a szövetek izolálására és tartósítására használt eljárások;

— az egysejtes szuszpenziók vagy sejtmagszuszpenziók előállítására szolgáló módszerek;

— valamennyi reagens eredete és tételszáma (amennyiben lehetséges);

— a citotoxicitás értékelésére szolgáló módszerek;

— az elektroforézis feltételei;

— az alkalmazott festési eljárások, valamint

— az üstökösök értékelésére és mérésére szolgáló módszerek.

Eredmények:

— az egyes állatokra vonatkozóan a vizsgálat időszaka előtt és során végzett általános klinikai megfigyelések, ha végeztek ilyeneket;

— a citotoxicitásra vonatkozó bizonyítékok, ha vizsgálták;

▼M7

— az egy hétnél hosszabb vizsgálatok esetében: az egyes állatok testtömege a vizsgálat során, beleértve minden csoportnál a testtömegtartományt, az átlagot és a szórást; táplálékfogyasztás;

— dózis-válasz összefüggés, amennyiben nyilvánvaló;

— az egyes szövetek/állatok esetében a csóva DNS %-os aránya (vagy más mérések, ha választottak ilyen méréseket), valamint a mediánértékek tárgylemezenként, az átlagértékek állatonként és az átlagértékek csoportonként;

— a párhuzamos és a történeti negatív és pozitív kontrolladatok, a tartományok, az átlagok/a mediánértékek és a szórás megadásával minden egyes értékelt szövetnél;

— a párhuzamos kontrolladatok és a történeti pozitív kontrolladatok;

— a májtól eltérő szöveteknél a pozitív kontroll felhasználásával ábrázolt dózis-válasz görbe. Ez a görbe előállítható a jártasság igazolása során gyűjtött adatokból (lásd a 16-17. pontot), és indoklással, az aktuális szakirodalomból származó idézetekkel kell alátámasztani, amelyek mutatják, hogy az adott szövetben a kontrollokra adott válaszok terjedelme és eloszlása megfelelő;

— az alkalmazott statisztikai elemzések és módszerek, valamint a válaszok pozitívvá, negatívvá vagy kétértelművé minősítésének kritériumai;

— az egyes csoportokban és állatonként előforduló fantomsejtek gyakorisága.

Az eredmények tárgyalása

Következtetés

Hivatkozások

SZAKIRODALOM

(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) E melléklet B.8.: *Akut inhalációs toxicitás: 28 napos vizsgálat* című fejezete.

(51) E melléklet B.29.: *Krónikus inhalációs toxicitás: 90 napos vizsgálat* című fejezete.

(52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.

(53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41.

(54) OECD (2002), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.

(56) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45–51.

(57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.

(58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.

▼**M7**

(59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.

(60) Bright, J. *et al.* (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.

(61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.

▼M7

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lúgos közegben végzett egysejtes gélelektroforézis: az egyes sejtek/sejtmagok szintjén bekövetkezett elsődleges DNS-károsodás kimutatására szolgáló, érzékeny eljárás.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Üstökös: a nukleoidok elektroforetikus mezőben felvett, az üstökösökéhez hasonlító alakja: a mag a sejtmag, a csóvát pedig a sejtmagból az elektromos mezőbe vándorló DNS alkotja.

Kritikus változó/paraméter: a protokoll változója, amelynek kismértékű változása jelentős hatást gyakorolhat a vizsgálat következtetésére. A kritikus változók szövetspecifikusak lehetnek. A kritikus változók nem módosítandók, különösen a vizsgálaton belül, annak figyelembevétele nélkül, hogy a módosítás hogyan változtatja meg a vizsgálaton belüli választ, például ahogyan a pozitív és a negatív kontrollok válaszának terjedelme és variabilitása azt jelzi. A Vizsgálati jegyzőkönyvben fel kell sorolni a kritikus változókat érintően a vizsgálat során vagy a laboratóriumra vonatkozó standard protokollhoz képest végzett változtatásokat, és azok mindegyikét meg kell indokolni.

Csóva-intenzitás vagy a csóva DNS %-os aránya: az üstököscsóva intenzitása a teljes intenzitáshoz (mag és csóva együttvéve) viszonyítva. A százalékos arányként kifejezett DNS-töredezettség mértékét tükrözi.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

▼M7

2. függelék

AZ IVAROK KÖZÖTTI ELTÉRÉSEK MEGHATÁROZÁSÁRA SZOLGÁLÓ FAKTORIÁLIS KÍSÉRLETTERVEZÉS AZ *IN VIVO* ÜSTÖKÖSVIZSGÁLAT SORÁN

A faktoriális kísérlettervezés és annak elemzése

Ebben a kísérlettervezésben legalább 5 hím és 5 nőstény vizsgálatára kerül sor mindegyik koncentrációszintnél, ami legalább 40 állat (20 hím és 20 nőstény, valamint a releváns pozitív kontrollok) felhasználását eredményezi.

A kísérlettervezés, amely az egyszerűbb faktoriális kísérlettervezések egyike, kétirányú varianciaanalízissel egyenértékű, ahol a fő tényezők az ivar és a koncentrációszintek. Az adatok számos standard statisztikai szoftvercsomag, például az SPSS, az SAS, a STATA, a Genstat, valamint az R használatával elemezhetők.

Az analízis az adatkészleten belül a variabilitást az ivarok közötti variabilitásra, a koncentrációk közötti variabilitásra, valamint az ivarok és a koncentrációk közötti kölcsönhatáshoz kapcsolódó variabilitásra osztja. Az egyes feltételeket ugyanazon koncentrációnak kitett, az azonos ivarú állatok csoportjain belüli párhuzamos állatok közötti variabilitás becsült értékéhez viszonyítva kell megvizsgálni. A mögöttes módszertanra vonatkozó kimerítő részletek számos statisztikai tankönyvben (lásd a hivatkozásokat) és a statisztikai szoftvercsomagokkal együtt biztosított súgófájlokban is megtalálhatók.

Az analízis az ivar x koncentráció kölcsönhatási feltételnek az ANOVA-táblázatban ([1]) való vizsgálatával folytatódik. Szignifikáns kölcsönhatás hiányában az egyes ivarok vagy az egyes koncentrációszintek közötti értékek kombinálásával érvényes statisztikai vizsgálat végezhető a szintek között, az ANOVA szerinti, csoporton belül összesített variabilitási feltétel alapján.

Az analízis a becsült koncentrációk közötti variabilitás kontrasztokká osztásával folytatódik, ami lehetővé teszi a válaszok lineáris és kvadratikus kontrasztjainak megállapítását valamennyi koncentrációszintnél. Ha az ivar x koncentráció kölcsönhatás szignifikáns, ez a feltétel lineáris x ivar és kvadratikus x ivar kölcsönhatására vonatkozó kontrasztokká osztható. E feltételek arra vonatkozó vizsgálatokat biztosítanak, hogy a koncentráció-válaszok párhuzamosak-e a két ivar esetében, illetve hogy a két ivar különböző választ ad-e.

A csoporton belül összesített variabilitásra vonatkozó becslés felhasználható az átlagok közötti eltérés páronkénti vizsgálatához. Ezek az összehasonlítások elvégezhetők a két ivarra vonatkozó átlagok között és a különböző koncentrációszintekre vonatkozó átlagok között; ilyen például a negatív kontrollok szintjével való összehasonlítás. Amennyiben szignifikáns kölcsönhatás tapasztalható, összehasonlítható a különböző koncentrációk adott ivaron belüli átlaga vagy az ivarok azonos koncentrációnál számított átlaga.

Hivatkozások

Számos olyan statisztikai tankönyv létezik, amely a faktoriális kísérlettervezések elméletét, kialakítását, módszertanát, elemzését és értelmezését tárgyalja, a legegyszerűbb kétfaktoros elemzéstől a kísérlettervezés módszertanában alkalmazott bonyolultabb formákig. Az alábbi nem kimerítő lista. Egyes könyvekben összehasonlítható kísérlettervezésekre vonatkozó kidolgozott példák találhatók, esetenként az analízisek különféle szoftvercsomagok segítségével történő lefuttatásához szükséges kóddal együtt.

([1]) Az általános lineáris modellekhez (General Linear Models; GLM) hasonló modellezési megközelítést alkalmazó statisztikusok az analízist ettől eltérő, de hasonló módon is megközelíthetik, azonban nem feltétlenül vezetik le a számítógépes korszak előtt kidolgozott statisztikaszámítás algoritmikus megközelítéseiig visszanyúló, hagyományos ANOVA-táblázatot.

▼**M7**

(1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

(2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

(3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

(4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

(5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

(6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

(7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

3. függelék

A VIZSGÁLAT JELENLEGI KORLÁTAI

A tudomány jelenlegi állása miatt az *in vivo* üstökösvizsgálathoz több korlát kapcsolódik. E korlátok várhatóan mérséklődni fognak vagy a meghatározásuk szűkebb körű lesz, mivel a vizsgálat alkalmazása terén szerzett több tapasztalat megválaszolja a szabályozási környezetben felmerülő biztonsági kérdéseket.

1. Előfordulhat, hogy a DNS-károsodások egyes típusai rövid ideig tartanak, azaz túl gyorsan reparálódnak ahhoz, hogy az utolsó dózist követő legalább 24 óra elteltével megfigyelhetőek legyenek. Nem található olyan lista, amely a rövid ideig tartó károsodásokat, illetve azokat a vegyi anyagokat tartalmazná, amelyek feltehetőleg ezt a károsodástípust okozzák, továbbá az sem ismert, hogy ez a károsodástípus mennyi ideig mutatható ki. Az optimális mintavételi időpont(ok) is lehet(nek) a vegyi anyagra vagy a beadási módra jellemzőek, és a mintavételi időpontokat kinetikus adatok alapján kell meghatározni, amennyiben rendelkezésre állnak ilyen adatok (például T_{max} időpontban, a plazmán vagy a szöveten belüli csúcskoncentráció elérésekor). Az e vizsgálati módszert alátámasztó validálási vizsgálatok többsége az utolsó dózis beadását követő 2 vagy 3 óra elteltével végzett boncolást határozott meg. A közzétett szakirodalomban található tanulmányokban az szerepel, hogy az utolsó dózist a leölés előtti 2–6 órán belül kell beadni. Ezért ezek a kísérletek szolgáltak alapul a vizsgálati módszer azon ajánlásához, hogy amennyiben az adatok nem utalnak másra, az utolsó dózist a boncolás előtti 2–6 órán belüli, meghatározott időpontban kell beadni.

2. Nem találhatók olyan vizsgálati adatok, amelyek azt jeleznék, hogy a vizsgálat mennyire érzékeny a táplálékba vagy az ivóvízbe juttatás után bekövetkező, rövid ideig tartó DNS-károsodás kimutatása tekintetében a gyomorszondán keresztüli beadáshoz képest. A táplálékba és az ivóvízbe juttatást követően kimutattak DNS-károsodást, ez azonban viszonylag kevés Vizsgálati jegyzőkönyvben szerepel a gyomorszondán keresztüli vagy a hasüregbe történő beadás terén szerzett jóval több tapasztalathoz képest. Ezért a vizsgálat érzékenysége csökkenhet olyan vegyi anyagok esetében, amelyek a táplálékba vagy az ivóvízbe juttatással idéznek elő rövid ideig tartó károsodást.

3. A májtól és a gyomortól eltérő szövetekben nem végeztek laboratóriumközi vizsgálatot, ezért nem születtek arra vonatkozó ajánlások, hogy hogyan kell érzékeny és reprodukálható választ elérni a májtól eltérő szövetekben, például a pozitív és negatív kontrollok tartományaival. A máj esetében a negatív kontrollra vonatkozó alacsonyabb határérték meghatározásával kapcsolatban sem sikerült megegyezni.

4. Bár több olyan kiadvány létezik, amely bebizonyítja a citotoxicitás *in vitro* körülmények közötti zavaró hatását, nagyon kevés *in vivo* adatot tettek közzé, ezért nem lehet egyetlen mérőszámot javasolni a citotoxicitásra. A gyulladáshoz, a sejtbeszűrődéshez, az apoptotikus vagy a nekrotikus elváltozásokhoz hasonló kórszövettani elváltozásokat összefüggésbe hozták a DNS-vándorlás fokozódásával, azonban ahogyan azt a JaCVAM validálási kísérlete (OECD, 2014) bebizonyítja, ezek az elváltozások nem mindig eredményeznek az üstökösök tekintetében pozitív megállapításokat, következésképp a DNS-vándorlás fokozódásával mindig összefüggő kórszövettani elváltozások végleges jegyzéke nem áll rendelkezésre. A fantomsejteket korábban a citotoxicitás egyik mutatójaként javasolták, azonban a fantomsejtek etiológiája bizonytalan. Rendelkezésre állnak olyan adatok, amelyek arra utalnak, hogy a fantomsejteket kiválthatja vegyi anyaggal összefüggő citotoxicitás, mechanikai/enzim által indukált károsodás a mintapreparálás során (Guerard *et al.*, 2014) és/vagy a vizsgálati vegyi anyag genotoxicitásának szélsőségesebb hatása. Úgy tűnik, más adatok azt jelzik, hogy a fantomsejtek a túlzott, de talán reparálható DNS-károsodásnak tulajdoníthatók (Lorenzo *et al*., 2013).

▼M7

5. A szöveteket vagy a sejtmagokat sikeresen lefagyasztják későbbi elemzés céljára. Ez rendszerint a vivőanyagos és a pozitív kontroll válaszára kifejtett, mérhető hatást eredményez (Recio *et al.,* 2010; Recio *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2013). Amennyiben a laboratórium alkalmaz fagyasztási módszereket, az e téren szerzett szakértelmét igazolnia kell, továbbá meg kell erősítenie a csóva DNS %-os arányának elfogadható alacsony tartományát a vivőanyaggal kezelt állatok célszöveteiben, és meg kell erősítenie, hogy továbbra is kimutathatók pozitív válaszok. A szakirodalomban különböző szövetfagyasztási módszerek szerepelnek. Jelenleg azonban nincs egyetértés azt illetően, hogy mi a szövetek fagyasztásának és felolvasztásának legmegfelelőbb módja, valamint azt illetően sem, hogy hogyan értékelendő, hogy egy esetlegesen módosult válasz befolyásolhatja a vizsgálat érzékenységét.

6. Közelmúltbeli munkák bizonyítják, hogy a kritikus változók jegyzéke várhatóan rövidebb, a kritikus változók paramétereinek meghatározása pedig pontosabb lesz (Guerard *et al*., 2014).

Hivatkozások

(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. REPRODUKCIÓS/FEJLŐDÉSI TOXICITÁSI SZŰRŐVIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 421. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. A vegyi anyagok vizsgálatának OECD-iránymutatásait időszakonként felülvizsgálják a tudományos fejlődés fényében. A szűrővizsgálatról szóló eredeti 421. irányelvet 1995-ben fogadták el egy „előzetes reprodukciós toxicitási szűrővizsgálat” protokollja alapján, amelyet két, 1990-ben Londonban (1) és 1992-ben Tokióban (2) megrendezett szakértői találkozón vitattak meg.

2. Az OECD által 1998-ban indított, a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint az endokrin rendszert esetlegesen károsító anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó új vizsgálati iránymutatások kidolgozására irányuló, kiemelt fontosságú tevékenység (3) folyományaként e vizsgálati módszert frissítették az endokrin rendszert károsító anyagok tekintetében releváns végpontokkal. Az OECD 407. iránymutatását (Rágcsálókon végzett 28 napos, ismételt dózisú orális toxicitási vizsgálat, e melléklet B.7. fejezete) például 2008-ban továbbfejlesztették olyan paraméterek bevezetésével, amelyek alkalmasak a vizsgálati vegyi anyagok endokrin rendszerre gyakorolt hatásának kimutatására. A 421. vizsgálati iránymutatást abból a célból frissítették, hogy azokba a szűrővizsgálatokat érintő vizsgálati iránymutatásokba, amelyek expozíciós időszakai lefedik a fejlődés egyes érzékeny szakaszait (prenatális vagy korai posztnatális időszakokat), bekerüljenek bizonyos, az endokrin rendszert károsító anyagok tekintetében releváns végpontok.

3. Az endokrin rendszert károsító anyagok kiválasztott további releváns végpontjait, amelyek részét képezik a 443. vizsgálati iránymutatásnak is (Kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat, e melléklet B.56. fejezete), belefoglalták a 421. vizsgálati iránymutatásba azon megvalósíthatósági tanulmány alapján, amely a belefoglalásukkal kapcsolatos tudományos és szakmai kérdésekkel, valamint a vizsgálati terv belefoglalásukhoz szükséges lehetséges módosításaival foglalkozott (4).

4. E vizsgálati módszer célja, hogy korlátozott információkat szolgáltasson a vizsgálati vegyi anyagoknak a hím és női szaporodási teljesítményre, azon belül az ivarmirigyek működésére, a párzási viselkedésre, a fogantatásra, a konceptus fejlődésére és az ellésre gyakorolt hatásairól. A módszer nem képezi a meglévő B.31., B.34., B.35. és B.56. vizsgálati módszer alternatíváját, és nem helyettesíti azokat.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

5. Ez a szűrővizsgálati módszer arra használható, hogy kiindulási pontként szolgáló információkat nyújtson a szaporodásra és/vagy a fejlődésre gyakorolt hatásokról, akár a vegyi anyagokra jellemző toxikológiai tulajdonságok felmérésének korai szakaszában, akár az aggodalomra okot adó vegyi anyagok esetében. Használható emellett olyan létező vegyi anyagok kezdeti szűrővizsgálatainak részeként, amelyekről nem vagy csak csekély mértékben állnak rendelkezésre toxikológiai adatok, továbbá szélesebb körű reprodukciós/fejlődési vizsgálatok dózistartomány-kereső vizsgálataként és egyéb releváns esetekben. A vizsgálatok elvégzése során a klinikai tüneteknek, mint a biztonsági értékeléshez használt kísérleti állatok humánus végpontjainak felismeréséről, értékeléséről és használatáról szóló 19. OECD-iránymutatásban (5) ismertetett vezérelveket és szempontokat kell követni.

▼M8

6. Ez a vizsgálati módszer nem nyújt teljes körű tájékoztatást a szaporodás és a fejlődés minden vonatkozásáról. Alkalmazhatósága különösen a prenatális expozíció posztnatális tüneteinek, valamint a posztnatális expozíció során előidézett hatások kimutatása tekintetében korlátozott. A dóziscsoportokat alkotó állatok viszonylag csekély száma, a végpontok szelektivitása, valamint a vizsgálat rövid időtartama (és egyéb okok) miatt ez a módszer nem szolgáltat bizonyítékot annak végleges megállapítására, hogy az adott vegyi anyag nem gyakorol hatást. Ezen túlmenően, más reprodukciós/fejlődési toxicitási vizsgálatokból nyert adatok hiányában a pozitív eredmények a veszély kezdeti értékelésére használhatók, illetve hozzájárulnak a további vizsgálatok szükségességére és időzítésére vonatkozó döntésekhez.

7. Az endokrin rendszerrel kapcsolatos paraméterek alkalmazásával kapott eredményeket az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére vonatkozó fogalmi keretének összefüggésében kell értelmezni (6). Ebben a fogalmi keretben az OECD továbbfejlesztett 421. vizsgálati iránymutatása a 4. szinten helyezkedik el, mint olyan *in vivo* vizsgálat, amely az endokrin rendszer releváns végpontjaira gyakorolt káros hatásokról szolgáltat adatokat. Egy endokrin jel önmagában azonban még nem tekinthető elegendő bizonyítéknak arra, hogy a vizsgálati vegyi anyag az endokrin rendszert károsító anyag lenne.

8. Ez a vizsgálati módszer a vizsgálati vegyi anyag orális adagolását feltételezi. Más beadási mód alkalmazása esetén szükség lehet a módszer kiigazítására.

9. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

10. A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

11. A vizsgálati vegyi anyagot fokozatosan növekvő dózisokban kell adagolni hím és nőstény állatok több csoportjának. A hímeket legalább négy hétig kell kezelni, egészen a tervezett elpusztításukat megelőző napig (ez az időtartam magában foglalja a pároztatást megelőző minimum két hetet, a párzási időszakot, valamint a pároztatást követő mintegy két hetes időszakot). Tekintettel a hímek pároztatást megelőző rövid kezelési időszakára, előfordulhat, hogy a termékenység nem kifejezetten érzékeny mutatója a heretoxicitásnak. Ezért a heréken mindenképpen részletes szövettani vizsgálatot kell végezni. A pároztatást megelőző kéthetes kezelési időszak és az azt követően a párzással/termékenységgel kapcsolatban tett megfigyelések, az összesen legalább négy hétig tartó kezelés, majd a hím ivarmirigyek részletes kórszövettani vizsgálata összességében elegendőnek bizonyulnak ahhoz, hogy kimutatható legyen a hím termékenységre és spermatogenezisre gyakorolt hatások többsége.

12. A nőstényeket a vizsgálat teljes időszaka alatt kezelni kell. Ez magában foglalja a párzást megelőző két hetes időszakot (amelynek célja, hogy lefedjen legalább két teljes ivari ciklust), a fogantatáshoz szükséges változó időtartamot, a vemhesség időszakát, az ellést követő legalább tizenhárom napot és a tervezett elpusztítást megelőző napig tartó további kezelést.

13. Az akklimatizációt és az ivari ciklus kezelés előtti felmérését követően megkezdett vizsgálat időtartama a nőstények teljesítményétől függően megközelítőleg 63 nap [legalább 14 napos pároztatás előtti időszak, (legfeljebb) 14 napos párzási időszak, 22 napos vemhesség és 13 napos szoptatás].

▼M8

14. Az adagolási időszakban az állatokat a toxicitás jeleinek észlelése érdekében minden nap gondosan megfigyelik. A vizsgálati időszak során elpusztult vagy elpusztított állatokat felboncolják, továbbá a vizsgálat befejezése után az életben maradt állatokat is elpusztítják és felboncolják.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

15. Ezt a vizsgálati módszert patkányok használatára tervezték. Ha az e vizsgálati módszerben meghatározott paramétereket más rágcsálófajon vizsgálják, a döntést részletesen indokolni kell. Az OECD (e melléklet B.7. fejezetének megfelelő) 407. vizsgálati iránymutatása alapján végzett nemzetközi validációs programban a patkány volt az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatására használt egyetlen faj. Nem szabad olyan törzseket alkalmazni, amelyek kevéssé termékenyek, vagy amelyekben magas a fejlődési defektusok előfordulási gyakorisága. Korábban vizsgálatban még részt nem vett, egészséges szűz állatokat kell használni. A kísérleti állatokat faj, törzs, nem, súly és kor szerint kell jellemezni. A vizsgálat kezdetén az állatok tömege közötti eltérésnek minimálisnak kell lennie és nem haladhatja meg az ivaronkénti átlag ± 20 %-át. Ha a vizsgálatot egy hosszú távú vagy teljes generáción ál tartó vizsgálat előzetes kísérleteként végzik, ajánlatos mindkét vizsgálathoz ugyanabból a törzsből való, azonos eredetű állatokat használni.

Az állatok tartása és etetése

16. Minden eljárásnak meg kell felelnie a laboratóriumi állatgondozásra vonatkozó helyi szabványoknak. A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének 22°C-nak (±3°C) kell lennie. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és az – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem haladhatja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgálati vegyi anyaggal való megfelelő keveredés igénye is befolyásolhatja, ha a vizsgálati vegyi anyagot a takarmánnyal adják be.

17. Az állatok azonos nemű egyedekből álló kisebb csoportokban tartandók; ha tudományos szempontból indokolt, az állatok egyedileg is elhelyezhetők. Ketrecben való csoportos elhelyezés esetén egy ketrecben legfeljebb öt állat tartható. A pároztatást erre a célra alkalmas ketrecekben kell végezni. A vemhes nőstényeket egyedileg kell elhelyezni, és el kell látni az alom kialakításához használt (fészeképítő) anyaggal. A szoptató nőstények és utódaik számára külön ketrecet kell biztosítani.

18. Rendszeresen ellenőrizni kell, hogy a takarmány nem tartalmaz-e szennyező anyagokat. A takarmányból egy mintát a jelentés véglegesítéséig meg kell őrizni.

Az állatok előkészítése

19. Egészséges, fiatal, ivarérett állatokat osztunk véletlenszerűen a kontroll- és kezelt csoportokba. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek a ketrec elhelyezéséből adódó esetleges hatások. Az állatokat az egyedi azonosíthatóság céljából megjelölik, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig a ketrecükben tartják a laboratóriumi körülményekhez való szoktatás céljából.

A dózisok előkészítése

20. A vizsgálati vegyi anyagot ajánlatos orálisan adagolni, kivéve ha más beadási módot tartanak megfelelőbbnek. Orális adagolás esetén a vizsgálati vegyi anyag beadása általában gyomorszondával történik; a vizsgálati vegyi anyagok azonban beadhatók a takarmánnyal vagy az ivóvízzel is.

▼M8

21. A vizsgálati vegyi anyagot szükség esetén alkalmas vivőanyagban feloldják vagy szuszpendálják. Lehetőség szerint elsősorban vizes oldatot/szuszpenziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (például kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. Meg kell határozni továbbá azt is, hogy a vizsgálati vegyi anyag mennyire stabil és homogén az adott vivőanyagban.

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

22. Az egyes csoportok kiindulási létszámát ajánlatos 10 hím és 12–13 nőstény egyedben meghatározni. Az expozíciót megelőzően felmérik a nőstények ivari ciklusát, és a szokásos 4–5 naptól eltérő időtartamú ciklussal rendelkező állatokat nem használják a vizsgálatban; ezért célszerű néhány plusz nőstényről gondoskodni, hogy végül maradjon csoportonként 10 nőstény. Ha nem mutatkoznak jelentős toxikus tünetek, ezzel a létszámmal várhatóan csoportonként legalább 8 vemhes nőstény biztosítható, ami a vemhes nőstények csoportonkénti elfogadható számának alsó határértéke. A cél az, hogy megfelelő mennyiségű vemhesség és utód jöjjön létre ahhoz, hogy érdemileg fel lehessen mérni a vizsgálati vegyi anyag hatását a termékenységre, a vemhességre, az anyai és a szopási viselkedésre, valamint az F_1 utódnemzedék növekedésére és fejlődésére a fogantatástól az ellést követő 13. napig.

Adagolás

23. Általánosan 3 kezelt csoportot és egy kontrollcsoportot alkalmaznak. A dózisok alapulhatnak az akut toxicitási vizsgálatok adatain vagy az ismételt dózisú vizsgálatok eredményein. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgálati vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Ha a vizsgálati vegyi anyag beadásához vivőanyagot alkalmaznak, a kontrollcsoportnak a vivőanyagból a felhasznált legnagyobb mennyiséget kell kapnia.

24. A dózisok kiválasztásánál figyelembe veszik a toxicitásra és (toxiko)kinetikára vonatkozóan rendelkezésre álló adatokat. Emellett ügyelni kell arra is, hogy érzékenység tekintetében különbségek lehetnek a vemhes és nem vemhes állatok között. A legmagasabb dózist úgy kell kiválasztani, hogy az toxikus tüneteket keltsen, de ne okozzon halált vagy súlyos szenvedést a kísérleti állatoknak. Ezt követően úgy kell csökkenő sorrendben kiválasztani a kisebb dózisokat, hogy meg lehessen határozni a dózissal összefüggő válaszokat, illetve a legkisebb dózisnál a nem észlelhető káros hatások szintjét (NOAEL). A csökkenő dózisok beállításához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása, a dózisok közötti nagyon nagy intervallumok (például 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazásával szemben pedig gyakran előnyben részesítendő egy negyedik vizsgálati csoport beiktatása.

25. Ha általános toxicitást (például testsúlycsökkenést, a májra, a szívre, a tüdőre vagy a vesére kifejtett hatásokat stb.) vagy egyéb, nem feltétlenül toxikus reakcióra utaló változásokat (például csökkent táplálékfogyasztást, májmegnagyobbodást) figyelnek meg, az endokrin rendszer szempontjából érzékeny végpontok tekintetében megfigyelt hatások értelmezésekor óvatosan kell eljárni.

Határérték-vizsgálat

26. Ha egy egyetlen, legalább 1 000 mg/testtömeg-kg/nap orális dózis felhasználásával végzett, vagy táplálékkal vagy ivóvízzel történő beadás esetén a táplálékban vagy ivóvízben ezzel egyenértékű százalékos arány alkalmazásával történő és az itt ismertetett eljárások szerint lefolytatott vizsgálat nem idéz elő észlelhető toxikus hatást, és ha a szerkezet tekintetében rokon anyagokra vonatkozó adatok alapján nem is várható a toxicitás bekövetkezése, a teljes, több dózist átfogó tanulmány elvégzése szükségtelennek tekinthető. Határérték-vizsgálatot kell minden esetben alkalmazni, kivéve, ha a humán expozíció magasabb orális dózis alkalmazását teszi szükségessé. Más típusú beadási módok, így például inhalálás vagy dermális alkalmazás esetén a vizsgálati vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságai gyakran előre jelezhetik a lehetséges koncentráció maximumát.

▼M8

A dózisok beadása

27. Az állatoknak a vizsgálati vegyi anyagot heti hét napon át, naponta adagolják. Ha a vizsgálati vegyi anyagot szondán át adagolják, lehetőleg egyetlen adagban kell gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át beadni. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. A térfogat nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömegarányt, kivéve vizes oldatok esetében, amikor 2 ml/100 g testtömegarány is alkalmazható. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy korrozív vizsgálati vegyi anyagok kivételével a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgálati vegyi anyag mennyiségének változásait, hogy a mennyiség valamennyi dózisnál konstans legyen.

28. A takarmánnyal vagy ivóvízzel adagolt vizsgálati vegyi anyagok esetében fontos annak biztosítása, hogy a vizsgálati vegyi anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt vagy a vízháztartás egyensúlyát. Ha a vizsgálati vegyi anyagot a táplálékkal együtt adják be, vagy állandó koncentrációban (ppm) keverik be, vagy az állat testsúlyától függő, állandó nagyságú dózisban adagolják; a kiválasztott alternatívát meg kell nevezni. A gyomorszondával bejuttatott vizsgálati vegyi anyagok esetében a dózist mindig a nap hasonló időszakában kell beadni, és legalább hetente újra be kell állítani ahhoz, hogy az állat testtömegéhez viszonyítva állandó értéken lehessen tartani.

A kísérleti program

29. Az adagolást mindkét nem esetében legalább 2 héttel a pároztatás előtt el kell kezdeni, miután az állatok legalább öt napon keresztül akklimatizálódtak, és (egy kéthetes kezelés előtti időszak során) ellenőrizték, hogy a nőstények ivari ciklusa megfelel-e a normál ciklusidőnek. A vizsgálatot úgy kell időzíteni, hogy az ivari ciklus értékelése röviddel a teljes ivarérettség elérését követően megkezdődjön. Ez az egyes laboratóriumokban használt különféle patkánytörzsek függvényében némileg változó, a Sprague-Dawley törzsbe tartozó patkányok esetében például 10 hetes korukban, a Wistar-törzsbe tartozók esetében pedig 12 hetes korukban következik be. Az utódokkal rendelkező anyaállatokat az ellést követő 13. napon vagy röviddel azután el kell pusztítani. A születés napja (vagyis amikor lezárul az ellés) a post-partum 0. napja. Azokat a nőstényeket, amelyek semmi jelét nem mutatják annak, hogy párosodtak volna, a párzási időszak utolsó napját követő 24–26 nappal el kell pusztítani. Az adagolást a párzási időszakban sem szabad abbahagyni egyik nem esetében sem. A hímeket a párzási időszakot követően továbbra is kezelni kell, legalább a minimális, 28 napos adagolási időszak végéig. Ezt követően leölik, vagy ha úgy ítélik megfelelőnek, megtartják azokat, és egy esetleges második pároztatás céljából tovább folytatják kezelésüket.

30. Az anyaállatok napi szintű kezelését folytatni kell a vemhesség teljes időszakán át egészen a post-partum 13. napjáig vagy az elpusztításukat megelőző napig. Azon vizsgálatoknál, amelyek keretében a vizsgálati vegyi anyagot inhalálás vagy dermális alkalmazás útján adják be, a kezelést folytatni kell legalább a vemhesség 19. napjáig, majd a lehető leghamarabb, de legkésőbb a 4. posztnatális napon újra kell kezdeni.

31. A kísérleti ütemterv ábráját a 2. függelék tartalmazza.

A pároztatási eljárás

32. Rendes esetben e vizsgálat során 1:1 (egy hím-egy nőstény) pároztatást kell alkalmazni. Ettől abban az esetben lehet eltekinteni, ha a hímek közül elpusztul valamelyik. A nőstényt egy adott hímmel kell összerakni, és addig kell együtt hagyni azokat, amíg meg nem győződtek a párzás megtörténtéről, vagy 2 hét el nem telik. Minden reggel meg kell vizsgálni, hogy a nőstényben észlelhető-e sperma vagy a hüvelydugó. A vemhesség 0. napja definíció szerint az a nap, amikor a párosodás tényét megerősítették (hüvelydugó vagy sperma figyelhető meg a nőstényben). Ha a pároztatás sikertelen volt, fontolóra lehet venni a nőstények újrapároztatását egy azonos csoportbeli és már sikeresen pároztatott hímmel.

▼M8

Az alom mérete

33. Az ellés utáni negyedik napon az egyes almok egyedszáma a létszám fölötti kölykök véletlenszerű eltávolításával módosítható, hogy almonként az eredmény – amennyire lehetséges – a használt patkánytörzsre jellemző ivaronkénti négy vagy öt utód legyen. Két létszám feletti kölyöktől vérmintát kell venni, egybe kell gyűjteni és fel kell használni a T4 szérumszintek meghatározásához. A kölykök szelektív, például a testtömeg vagy az anogenitális távolság (AGD) alapján történő eltávolítása nem elfogadható. Ha a hím és nőstény utódok száma nem teszi lehetővé a nemenként négy vagy öt azonos nemű utódot tartalmazó almok kialakítását, részleges kiegyenlítés is elfogadható (például hat hím és négy nőstény). Amennyiben az alom egyedszáma a selejtezési célérték (almonként 8 vagy 10 utód) alá csökkenne, nem kell eltávolítani kölyköket. Ha az alom mérete csupán eggyel haladja meg a selejtezési célértéket, csak egy kölyköt távolítanak el, és attól vesznek vért a T4 szérumszintek esetleges értékelésekhez.

34. Ha nem igazítják ki az alom egyedszámát, az ellést követő 4. napon almonként két kölyköt elpusztítanak, és vérmintát vesznek tőlük a pajzsmirigyhormonok szérumkoncentrációjának méréséhez. Lehetőség szerint az almonkénti két kölyök nőstény legyen, hogy maradjanak hímek az emlőbimbó-visszamaradás megállapításához, kivéve abban az esetben, ha a nőstény utódok eltávolítása miatt nem maradna nőstény a vizsgálat végi értékeléshez. Amennyiben az egyedszám az almonkénti 8 vagy 10 utód alá esne (a használt patkánytörzsre jellemző szokásos alommérettől függően), nem kell eltávolítani kölyköket. Ha az alom egyedszáma csupán eggyel haladja meg az alom szokásos méretét, csak egy kölyköt távolítanak el, és attól vesznek vért a T4 szérumszintek esetleges értékelésekhez.

Megfigyelések élő állatban

Klinikai megfigyelések

35. A vizsgálat teljes időtartama alatt általános klinikai megfigyeléseket legalább naponta kell végezni, vagy gyakrabban, ha toxicitás jelei figyelhetők meg. A megfigyeléseket lehetőleg mindig a nap azonos időszakában/időszakaiban kell végezni, figyelembe véve azt is, hogy a várt hatások a dózis beadása után mikor érik el a maximumukat. Feljegyzést kell készíteni a lényeges magatartászavarokról, az elhúzódó vagy nehéz ellés jeleiről, valamint a toxikus hatásra utaló minden egyéb tünetről, beleértve a mortalitást is. A feljegyzéseknek tartalmazniuk kell a toxicitási tünetek fellépésének időpontját, mértékét és időtartamát.

Testtömeg és táplálék-/vízfogyasztás

36. A hímek és nőstények testsúlyát meg kell mérni az adagolás első napján, majd ezt követően legalább hetente és a vizsgálat végén meg kell ismételni a mérést. A nőstényeket a vemhesség alatt a 0., 7., 14. és 20. napon kell megmérni, továbbá az ellést követő 24 órán belül (a post-partum 0. vagy 1. napján) és legalább a post-partum 4. és 13. napján. A megfigyeléseket minden egyes felnőtt állat esetében külön-külön kell rögzíteni.

37. A pároztatás előtt, valamint a vemhesség és a szoptatás ideje alatt a takarmányfogyasztást legalább hetente kell mérni. A párzási időszak során nem kell feltétlenül mérni a takarmányfogyasztást. Ha a vizsgálati vegyi anyagot az ivóvízzel adagolják, ezen időszakok során a vízfogyasztást is mérni kell.

Ivari ciklus

38. A kezelés megkezdése előtt ellenőrizni kell az ivari ciklust, hogy szabályos ciklussal rendelkező nőstények kerüljenek kiválasztásra a vizsgálathoz (lásd a 22. pontot). Emellett napi szinten kell vizsgálni a hüvelyi kenetet is, a kezelési időszak kezdetétől mindaddig, amíg be nem bizonyosodik, hogy

▼M8

megtörtént a párzás. Ha felmerül a lehetősége annak, hogy az adagolás megkezdése olyan akut stresszhatást idéz elő, amely módosíthatja az ivari ciklust, a laboratóriumok eljárhatnak úgy is, hogy két hétig kezelik a vizsgált állatokat, majd a pároztatás előtti időszakban legalább két hétig naponta hüvelyi kenetet vesznek az ivari ciklus ellenőrzéséhez, amelyet a párzási időszak során is folyamatosan figyelemmel kísérnek egészen a párzás megtörténtéig. A hüvelyi/méhnyaki sejtvétel során Ügyelni kell arra, hogy meg ne sérüljön a nyálkahártya, mert az álvemhességet idézhet elő (7) (8).

Az utódok paraméterei

39. A vemhesség nulladik napjától számítandó terhességi (gesztációs) időszakról feljegyzést kell készíteni. Az ellés után minden almot a lehető leghamarabb meg kell vizsgálni a kölykök számának és ivarának, a halvaszületések, élveszületések és fejletlen egyedek (a megfelelő kontrollcsoportba tartozó kölyköknél jelentősen kisebb utódok) számának, valamint a súlyos rendellenességek jelenlétének megállapításához.

40. Az élő kölyköket meg kell számolni, nemüket meg kell állapítani, és az almok egyedeinek súlyát meg kell mérni a születést követő 24 órán belül (a post-partum 0. vagy 1. napján) és legalább a post-partum 4. és 13. napján. A 35. pontban említett megfigyelések mellett az utódok minden rendellenes viselkedéséről be kell számolni.

41. Az anogenitális távolságot (AGD) minden utódon legalább egy alkalommal meg kell mérni a 0. és 4. posztnatális nap között. A kölykök testtömegét azon a napon kell megmérni, amikor az AGD-t is mérik, és az AGD-t normálni kell a kölykök méretére, ami lehetőleg a testtömeg köbgyöke (9). Az OECD 151. vizsgálati iránymutatásának (10) ajánlása szerint a hím utódok emlőbimbóinak/emlőbimbóudvarainak számát meg kell számolni a 12. vagy 13. posztnatális napon.

Klinikai biokémiai vizsgálatok

42. Vérmintákat egy meghatározott helyről kell venni, az alábbi ütemezés szerint:

— almonként legalább két kölyöktől a születést követő 4. napon, amennyiben azt az utódok száma lehetővé teszi (lásd a 33–34. pontot),

— az összes anyaállattól és almonként legalább két kölyöktől a vizsgálat végét jelentő 13. napon, és

— az összes felnőtt hímtől a vizsgálat végén,

A vérmintákat megfelelő körülmények között tárolják. A 13 napos utódoktól és a felnőtt hímektől vett vérminták alapján értékelik a pajzsmirigyhormon (T4) szérumszinteket. Szükség esetén a T4 további értékeléséhez felhasználhatók az anyaállatoktól és a 4 napos utódoktól vett vérminták. Ha a vizsgálat szempontjából lényeges, más hormonok is mérhetők. A pajzsmirigyhormon analízisekhez almonként egyesíteni lehet a kölyköktől vett vérmintákat. A pajzsmirigyhormonokra (T4 és TSH) vonatkozó mérésekhez lehetőleg a teljes vérmintát kell használni.

43. A hormonok meghatározásának variabilitását és az azzal kapott abszolút koncentrációt az alábbi tényezők befolyásolhatják:

— az elpusztítás időpontja, tekintettel a hormonkoncentrációk nap folyamán tapasztalható ingadozására,

— az állatot érő indokolatlan stressz elkerülése érdekében alkalmazott elpusztítási mód, amely hatással lehet a hormonkoncentrációkra,

— a hormonmeghatározásokhoz alkalmazott, standard görbéjük tekintetében esetlegesen eltérő vizsgálati készletek.

▼M8

44. A kifejezetten hormon-meghatározási célra szánt plazmamintákat a nap hasonló időpontjában kell gyűjteni. A kereskedelmi fogalomban kapható különböző vizsgálati készletek eltérő számszerű értékeket adnak a hormonkoncentrációk elemzése során.

Patológia

Makroszkópos boncolás

45. A vizsgálat során bekövetkező elpusztítás vagy elhullás időpontjában makroszkóposan meg kell vizsgálni a felnőtt állatokban az esetleges rendellenességeket vagy patológiás elváltozásokat. Külön figyelmet kell szentelni a szaporítószerveknek. A beágyazódási helyek számát fel kell jegyezni. A boncolás napjának reggelén meg kell vizsgálni a hüvelyi kenetet az ivari ciklus aktuális szakaszának meghatározásához, hogy lehetővé váljon a korreláció felállítása a petefészkek kórszövettanával.

46. Az összes hím felnőtt állat heréit és mellékheréit, prosztatáját és ondóhólyagjait a koaguláló mirigyekkel egy egységként meg kell tisztítani minden rátapadt szövettől, és a kiszáradás megelőzése érdekében a boncolást követően a lehető legrövidebb időn belül meg kell mérni nedves tömegüket. Ezen túlmenően további szervtömegmérések végezhetők hímeknél a végbélemelő és a bulbocavernosus izomra, a Cowper-mirigyekre és a glans penisre, nőstényeknél a páros petefészekre (nedves tömeg) és a méhre (valamint a méhnyakra) kiterjedőleg; ha ezeket a szerveket is bevonják a mérésbe, tömegüket a boncolás után lehető leghamarabb meg kell határozni.

47. Az elhullott és a post-partum 13. napján vagy röviddel azután elpusztított utódokat legalább külsőleg alaposan meg kell vizsgálni, hogy láthatók-e rajtuk súlyos rendellenességek. Különös figyelmet kell szentelni a külső ivarszervek vizsgálatának, és ezen belül a rendellenes fejlődés jeleinek. A 13. napon almonként 1 hím és 1 nőstény utód pajzsmirigyét meg kell őrizni.

48. Ezenfelül meg kell őrizni az összes felnőtt állat petefészkeit, heréit, a járulékos ivarszerveket (a méhet és a méhnyakat, a mellékheréket, a prosztatát és az ondóhólyagokat a koaguláló mirigyekkel), a pajzsmirigyet, valamint a makroszkópos vizsgálat során léziókat mutató szerveket. A herék és mellékherék rutinvizsgálatához a formalinos fixálás használata nem ajánlott. E szövetek elfogadható vizsgálati módszere a Bouin-féle vagy a módosított Davidson-féle fixáló használata (11). A tunica albugineán a fixálószer gyors bejutása érdekében tűvel óvatosan sekély szúrást lehet ejteni a szerv mindkét végén.

Kórszövettan

49. Részletes szövettani vizsgálatot kell végrehajtani a legmagasabb dózissal kezelt csoportba és a kontrollcsoportba tartozó állatok petefészkein, heréin és mellékheréin (különös figyelmet fordítva a spermatogenezis szakaszaira és a here intersticiális sejtjeinek felépítésére). Amennyiben szükséges, vizsgálni lehet az utódoktól és a felnőtt állatoktól származó egyéb megőrzött szerveket, például a pajzsmirigyet. A pajzsmirigy súlya a fixálást követően is meghatározható. A megtisztítás a szövetkárosodás elkerülése érdekében ez esetben is igen óvatosan, kizárólag a fixálást követően végzendő el. A szövetkárosodás veszélyeztetheti a kórszövettani elemzést. Ha a legmagasabb dózissal kezelt csoport egyedei esetében elváltozások figyelhetők meg, a vizsgálatokat a többi, más dózissal kezelt csoport egyedeire is ki kell terjeszteni. A kórszövettani iránymutatás (11) további információkat tartalmaz az endokrin szövetek boncolásával, fixálásával, metszeteinek elkészítésével és kórszövettani vizsgálatával kapcsolatban.

▼M8

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

50. Az állatokra vonatkozóan egyedi adatsorokat kell felvenni. Emellett minden adatot táblázatos formában is össze kell foglalni, amelyben minden egyes vizsgálati csoport esetében fel kell tüntetni az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a vizsgálat során elpusztult vagy humánus okok miatt exterminált állatok számát, az elhullások és a humánus okok miatti elpusztítások időpontját, a termékeny állatok számát, a vemhes nőstények számát, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ezen belül bármely toxikus tünet megjelenésének időpontját, valamint ezek időtartamát és súlyosságát, a kórszövettani elváltozások típusait és az almokra vonatkozó minden idevágó adatot. A 3. mellékletben közzéteszünk egy, a reprodukciós/fejlődési hatások értékelése során nagyon hasznosnak bizonyult táblázatos formájú, összefoglaló jelentést.

51. A vizsgálat korlátozott terjedelme miatt a „szignifikancia” felmérésére szolgáló vizsgálatok formájában végzett statisztikai elemzések számos végpont, különösen a reprodukciós végpontok szempontjából csekély jelentőséggel bírnak. Amennyiben statisztikai elemzésekre támaszkodnak, még a vizsgálat megkezdése előtt olyan módszert kell választani, amelyik megfelel a vizsgált változók eloszlásának. Az anogenitális távolság és az emlőbimbó-visszamaradás statisztikai elemzésének az utódokra vonatkozó egyedi adatokon kell alapulnia, ugyanakkor figyelembe kell vinni az alom által gyakorolt hatásokat. Ahol megfelelő, az elemzés egysége az alom. A kölykök testsúlyára vonatkozó statisztikai elemzésnek a kölykök egyedi adatain kell alapulnia, ugyanakkor figyelembe kell vinni az alom által gyakorolt hatásokat. A csoportok alacsony egyedszáma miatt az esetleg rendelkezésre álló (pl. az alomméretre vonatkozó) korábbi kontrolladatok szintén hasznos segítséget nyújthatnak a vizsgálat értelmezéséhez.

Az eredmények értékelése

52. E toxicitási vizsgálat eredményeit a megfigyelt hatások, valamint a boncolási és mikroszkópos eredmények szempontjából kell értékelni. Az értékelés során ki kell térni a vizsgálati vegyi anyag dózisa és a rendellenességek, ezen belül a súlyos léziók, az azonosított célszervek, a terméketlenség, a klinikai rendellenességek, a csökkent reproduktív teljesítmény és egyedszám, a testtömegváltozások, a mortalitásra gyakorolt hatások és egyéb toxikus hatások megléte vagy hiánya, illetve gyakorisága és súlyossága közötti összefüggésekre.

53. A hímek rövid kezelési időszaka miatt a hímekre gyakorolt reprodukciós hatások felmérése során figyelembe kell venni a herék és mellékherék kórszövettanát, valamint a termékenységre vonatkozó adatokat. A szaporodásra/fejlődésre (pl. alomméretre, anogenitális távolságra, emlőbimbó-visszamaradásra, T4 szérumszintekre) vonatkozólag rendelkezésre álló történeti kontrolladatok szintén hasznos segítséget nyújthatnak a vizsgálat értelmezéséhez.

54. A minőség-ellenőrzéshez javasolt történeti kontrolladatokat gyűjteni, a számszerű adatokhoz pedig kiszámítani a variációs együtthatót, különösen az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatásával összefüggő paraméterek tekintetében. Ezek az adatok felhasználhatók összehasonlítási célokra a tényleges vizsgálatok kiértékelése során.

Vizsgálati jelentés

55. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

— eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

▼**M8**

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

Vivőanyag (ha van):

— a vivőanyag megválasztásának indokolása, ha az nem víz.

Kísérleti állatok:

— használt faj/törzs;

— az állatok száma, kora és neme;

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.;

— az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetekor;

— patkánytól eltérő faj alkalmazásának indokolása.

Vizsgálati körülmények:

— a dózisok kiválasztásának indokolása;

— a vizsgálati vegyi anyag formulázásával/a takarmány előkészítésével, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenitásával kapcsolatos adatok;

— a vizsgálati vegyi anyag beadására vonatkozó részletek;

— átszámítás a vizsgálati vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/kg testsúly/nap), ha ez alkalmazható;

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek;

— a selejtezés során a kölykök kiválasztására használat randomizálási eljárás részletes leírása, ha sor került selejtezésre.

Eredmények:

— testsúly és annak változásai;

— táplálék- és vízfogyasztásra vonatkozó adatok, ha rendelkezésre állnak;

— a toxikus reakciók adatai nemenként és dózisonként, beleértve a termékenységet, a gesztációs időt és a toxicitás egyéb tüneteit is;

— a vemhesség időtartama;

— a szaporodásra, az utódokra, a posztnatális növekedésre stb. gyakorolt toxikus vagy egyéb hatások;

— a klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (a változások visszafordíthatók-e vagy sem);

— normális vagy abnormális ivari ciklust mutató felnőtt nőstények száma és a ciklus időtartama;

— az élveszületések száma és a beágyazódás utáni veszteség;

— utódok testsúlyadatai;

— az összes utód anogenitális távolsága (és az AGD-mérés napján rögzített testsúlyuk);

▼M8

— emlőbimbó-visszamaradás a hím utódoknál;

— pajzsmirigyhormonok szintje 13 napos kölyköknél és felnőtt hímeknél (és ha mérték, az anyaállatoknál és 4 napos kölyköknél);

— a szemmel jól látható rendellenességeket mutató utódok száma, a külső nemi szervek makroszkopikus értékelése, a fejletlen utódok száma;

— a vizsgálat során bekövetkezett elhullás ideje, illetve hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét;

— a beágyazódások száma, az alomméret és az almokban lévő egyedek méréskor rögzített testsúlya;

— a testtömeg az elpusztításkor, valamint a szülők szervtömegadatai;

— boncolási eredmények;

— a kórszövettani leletek részletes ismertetése;

— felszívódási adatok (ha vannak);

— adott esetben az eredmények statisztikai feldolgozása.

Az eredmények értékelése.

Következtetések

Az eredmények értelmezése

56. Ez a vizsgálat az ismételt dózisok útján történő kezeléssel összefüggésben kimutatható reprodukciós/fejlődési toxicitás értékelésére szolgál (lásd az 5. és a 6. pontot). Jelezheti a további vizsgálatok szükségességét, és iránymutatást nyújt a későbbi vizsgálatok kialakításához. A szaporodási és fejlődési eredmények értelmezésével kapcsolatban az OECD 43. iránymutatását kell alkalmazni (12). A rágcsálókon végzett endokrin és reprodukciós vizsgálatok szövettani értékeléséről szóló 106. OECD-iránymutatás (11) olyan információkkal szolgál az (endokrin) szervek és a hüvelyi kenet előkészítéséről és értékeléséről, amelyek segítséget nyújthatnak e vizsgálati iránymutatáshoz.

SZAKIRODALOM

(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. Kérésre elérhető a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezetnél, Párizs.

(3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Kérésre elérhető a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezetnél, Párizs.

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

▼**M8**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK (LÁSD MÉG: OECD 150. IRÁNYMUTATÁSA (6))

Androgenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében természetes androgén hormonokhoz (például a tesztoszteronhoz) hasonló hatást fejtsen ki.

Antiandrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes androgén hormonok (például a tesztoszteron) hatását gátolja.

Antiösztrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes ösztrogén hormonok (például a 17ß-ösztradiol) hatását gátolja.

Antitiroid hatás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes pajzsmirigyhormon (például a $T_{3)}$ hatását gátolja.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Fejlődési toxicitás: reprodukciós toxicitás kifejeződése az utódokban pre-, peri-, posztnatális, szerkezeti vagy funkcionális rendellenességek formájában.

Adagolás: általános fogalom, amely a dózist, valamint az adagolás gyakoriságát és időtartamát foglalja magában.

Dózis: a vizsgálati vegyi anyag beadott mennyisége. A dózist a vizsgálati vegyi anyag súlyának és a kísérleti állat egységnyi testsúlyának napi hányadosaként (például mg/testsúlykilogramm/nap), vagy a takarmányban lévő állandó koncentrációként fejezik ki.

Nyilvánvaló toxicitás: általános fogalom, amely a toxicitás vizsgálati vegyi anyag beadását követően kialakuló egyértelmű tüneteire vonatkozik. E tüneteknek elegendőnek kell lenniük a veszély értékeléséhez, továbbá olyan szintet kell képviselniük, amelynél a beadott dózis növelése várhatóan a toxicitás súlyos jeleinek kialakulásához és valószínű mortalitáshoz vezet.

Termékenységkárosodás: a hím vagy női szaporodási funkciók vagy képesség terén jelentkező rendellenességeket jelenti.

Anyai toxicitás: a vemhes nőstényeket érő káros hatások, amelyek történhetnek specifikusan (közvetlen hatás) vagy nem specifikusan (közvetett hatás).

NOAEL: a „no-observed-adverse-effect level” (nem észlelhető káros hatásszint) rövidítése. Ez a legmagasabb dózis, amelynél még nem figyelhetők meg a kezelés okozta káros hatások.

Ösztrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes ösztrogén hormonokhoz (például a 17ß-ösztradiolhoz) hasonló hatást fejtsen ki.

Reprodukciós toxicitás: az utódoknál jelentkező káros hatásokat és/vagy a hím vagy női szaporodási funkciók vagy képesség csökkenését jelenti.

Vizsgálati vegyi anyag: az e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

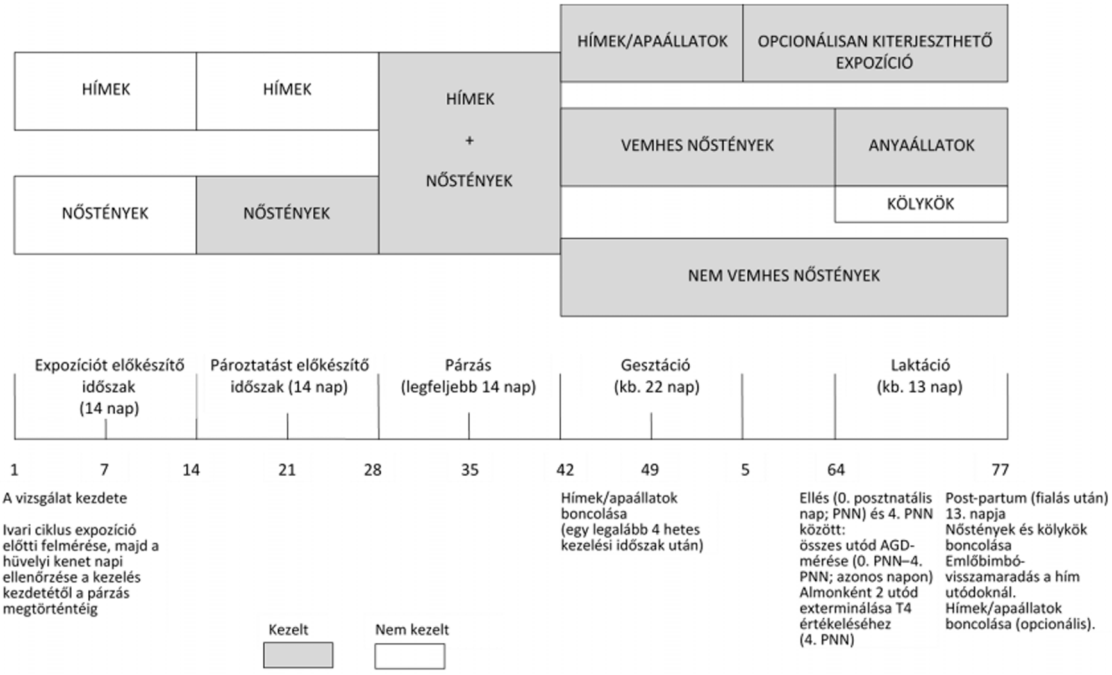
Tiroid hatás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes pajzsmirigyhormonhoz (például a T_3-hoz) hasonló hatást gyakoroljon.

Validáció: tudományos folyamat, amelynek célja egy adott vizsgálati módszer működési követelményeinek és korlátjainak jellemzése, valamint megbízhatóságának és egy adott célhoz kapcsolódó relevanciájának igazolása.

▼**M8**

2. függelék

A KÍSÉRLETI ÜTEMTERV ÁBRÁJA, AMELY JELZI A VIZSGÁLAT TELJES 14 NAPOS PÁRZÁSI IDŐSZAKON ALAPULÓ MAXIMÁLIS IDŐTARTAMÁT



▼**M8**

3. függelék

TÁBLÁZATOS ÖSSZEFOGLALÓ JELENTÉS A SZAPORODÁSRA/FEJLŐDÉSRE GYAKOROLT HATÁSOKRÓL

MEGFIGYELÉSEK	ÉRTÉKEK				
Adagolás (egységek)	0 (kontroll)	...	...	...	...
Kezdő párok (Sz)					
Ivari ciklus (legalább az átlagos időtartam és az irreguláris ciklusok gyakorisága)					
Bizonyítottan párosított nőstények (Sz)					
Vemhességet elért nőstények (Sz)					
Fogantatás napja 1–5. (Sz)					
Fogantatás napja 6–...([1])) (Sz)					
Vemhesség ≤ 21 nap (Sz)					
Vemhesség = 22 nap (Sz)					
Vemhesség ≥ 23 nap (Sz)					
Élve született utódokkal rendelkező anyaállatok (Sz)					
Post-partum 4. napján élő utódokkal rendelkező anyaállatok (Sz)					
Beágyazódások/anyaállat (átlag)					
Élő utódok/anyaállat az ellésnél (átlag)					
Élő utódok/anyaállat a 4. napon (átlag)					
Ivararány (h/n) az ellésénél (átlag)					
Ivararány (h/n) a 4. napon (átlag)					
Alom egyedsúlya az ellésnél (átlag)					
Alom egyedsúlya a 4. napon (átlag)					
Utódok súlya születéskor (átlag)					
Utódok súlya az AGD-mérés időpontjában (hímek átlaga, nőstények átlaga)					

▼M8

MEGFIGYELÉSEK	ÉRTÉKEK				
Adagolás (egységek)	0 (kontroll)	...	...	...	...
Utódok AGD-értéke ugyanazon a posztnatális napon, születés – 4. nap (hímek átlaga, nőstények átlaga, posztnatális nap feljegyzése)					
Utódok súlya a 4. napon (átlag)					
Hím utódok emlőbimbó-visszamaradása a 13. napon (átlag)					
Utódok súlya a 13. napon (átlag)					
RENDELLENES UTÓDOK					
Anyaállatok 0-val					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok ≥ 2-vel					
UTÓDOK ELVESZTÉSE					
Prenatális/poszt-implantációs időszak (beágyazódások mínusz élveszületések száma)					
Anyaállatok 0-vel					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok 2-vel					
Anyaállatok ≥ 3-mal					
Posztnatális időszak (élveszületések mínusz a 13. posztnatális napon élők száma)					
Anyaállatok 0-vel					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok 2-vel					
Anyaállatok ≥ 3-mal					

([1]) a párzási időszak utolsó napja

▼M8

B.64. KOMBINÁLT ISMÉTELT DÓZISÚ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT ÉS REPRODUKCIÓS/FEJLŐDÉSI TOXICITÁSI SZŰRŐVIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 422. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. A vegyi anyagok vizsgálatának OECD-iránymutatásait időszakonként felülvizsgálják a tudományos fejlődés fényében. A szűrővizsgálatról szóló eredeti 422. vizsgálati iránymutatást 1996-ban fogadták el a „kombinált ismételt dózisú és reprodukciós/fejlődési szűrővizsgálat” protokollja alapján, amelyet két, 1990-ben Londonban (1) és 1992-ben Tokióban (2) megrendezett szakértői találkozón vitattak meg.

2. Ez a vizsgálati módszer két vizsgálatot ötvöz, egyfelől egy reprodukciós/fejlődési toxicitási szűrővizsgálatot, amely részben a már létező és nagy mennyiségben előállított vegyi anyagokra vonatkozó eredeti módszer alkalmazása során a tagállamokban szerzett tapasztalatokon, részben a pozitív kontrollanyagokkal végzett kísérletekben szerzett ismereteken alapul (3) (4), másfelől egy ismételt dózisú toxicitási vizsgálatot, amely összhangban áll az OECD 407. vizsgálati iránymutatásával (Rágcsálókon végzett 28 napos, ismételt dózisú orális toxicitási tanulmány, e melléklet B.7. fejezete).

3. Az OECD által 1998-ban indított, a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint az endokrin rendszert esetlegesen károsító anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó új vizsgálati iránymutatások kidolgozására irányuló, kiemelt fontosságú tevékenység (5) folyományaként e vizsgálati módszert frissítették az endokrin rendszert károsító anyagok tekintetében releváns végpontokkal. Ebben az összefüggésben az (e melléklet B.7. fejezetének megfelelő) 407. vizsgálati iránymutatást 2008-ban továbbfejlesztették olyan paraméterekkel, amelyek alkalmasak a vizsgálati vegyi anyagok endokrin rendszerre gyakorolt hatásának kimutatására. A 422. vizsgálati iránymutatást abból a célból frissítették, hogy azokba a szűrővizsgálatokat érintő vizsgálati iránymutatásokba, amelyek expozíciós időszakai lefedik a fejlődés egyes érzékeny szakaszait (prenatális vagy korai posztnatális időszakokat), bekerüljenek bizonyos, az endokrin rendszert károsító anyagok tekintetében releváns végpontok.

4. Az endokrin rendszert károsító anyagok tekintetében releváns kiválasztott végpontokat, amelyek részét képezik a 443. vizsgálati iránymutatásnak is (Kibővített egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat, amely e melléklet B.56. fejezetének felel meg), belefoglalták a 422. vizsgálati iránymutatásba azon megvalósíthatósági tanulmány alapján, amely a belefoglalásukkal kapcsolatos tudományos és szakmai kérdésekkel, valamint a vizsgálati terv belefoglalásukhoz szükséges lehetséges módosításaival foglalkozott (6).

5. E vizsgálati módszer célja, hogy korlátozott információkat szolgáltasson a vizsgálati vegyi anyagoknak a hím és női szaporodási teljesítményre, azon belül az ivarmirigyek működésére, a párzási viselkedésre, a fogantatásra, a konceptus fejlődésére és az ellésre gyakorolt hatásairól. A módszer nem képezi a meglévő B.31., B.34., B.35. és B.56. vizsgálati módszer alternatíváját, és nem helyettesíti azokat.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

6. Egy vizsgálati vegyi anyag toxikus jellemzőinek értékelése és felmérése során az ismételt dózisú orális toxicitást azután lehet meghatározni, hogy az akut vizsgálatok kezdeti eredményei már rendelkezésre állnak. Ez a vizsgálat ismereteket szolgáltat azokról a lehetséges egészségügyi veszélyekről, amelyek egy viszonylag korlátozott időszakon keresztül ismétlődő expozíció következtében alakulhatnak ki. A módszer egy alapvető, ismételt dózisú toxicitási vizsgálatot foglal magában, amely a 90 napos vizsgálatot nem igénylő vegyi anyagok esetén (például abban az esetben, ha az előállított mennyiség nem halad meg bizonyos határértékeket), vagy egy hosszú távú vizsgálat előzetes vizsgálataként alkalmazható. A vizsgálatok elvégzése során a klinikai tüneteknek, mint a biztonsági értékeléshez használt kísérleti állatok humánus végpontjainak felismeréséről, értékeléséről és használatáról szóló 19. OECD-iránymutatásban (7) ismertetett vezérelveket és szempontokat kell követni.

▼M8

7. A módszer magában foglal továbbá egy reprodukciós/fejlődési toxicitási vizsgálatot, ezért használható arra is, hogy kiindulási pontként szolgáló információkat nyújtson a hím és női szaporodási teljesítményre, azon belül az ivarmirigyek működésére, a párzási viselkedésre, a fogantatásra, a konceptus fejlődésére és az ellésre gyakorolt lehetséges hatásokról, akár a vegyi anyagokra jellemző toxikológiai tulajdonságok felmérésének korai szakaszában, akár az érintett vegyi anyagok esetében. Ez a vizsgálati módszer nem nyújt teljes körű tájékoztatást a szaporodás és a fejlődés minden vonatkozásáról. Alkalmazhatósága különösen a prenatális expozíció posztnatális tüneteinek, valamint a posztnatális expozíció során esetlegesen előidézett hatásoknak a kimutatása tekintetében korlátozott. A végpontok szelektivitása, a vizsgálat rövid időtartama (és egyéb okok) miatt ez a módszer nem szolgáltat bizonyítékot annak végleges megállapítására, hogy az adott vegyi anyag nem gyakorol hatást a szaporodásra/fejlődésre. Ezen túlmenően, más reprodukciós/fejlődési toxicitási vizsgálatokból nyert adatok hiányában a pozitív eredmények a veszély kezdeti értékelésére használhatók, illetve hozzájárulnak a további vizsgálatok szükségességére és időzítésére vonatkozó döntésekhez.

8. Az endokrin rendszerrel kapcsolatos paraméterek alkalmazásával kapott eredményeket az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére vonatkozó fogalmi keretének összefüggésében kell értelmezni (8). Ebben a fogalmi keretben az OECD továbbfejlesztett 422. vizsgálati iránymutatása a 4. szinten helyezkedik el, mint olyan *in vivo* vizsgálat, amely az endokrin rendszer releváns végpontjaira gyakorolt káros hatásokról szolgáltat adatokat. Egy endokrin jel önmagában azonban még nem tekinthető elegendő bizonyítéknak arra, hogy a vizsgálati vegyi anyag az endokrin rendszert károsító anyag lenne.

9. A vizsgálati módszer emellett hangsúlyt fektet a neurológiai hatásokra mint különleges végpontra, valamint az állatok gondos klinikai megfigyelésének jelentőségére a lehető legtöbb információ megszerzése érdekében. A módszer segítségével azonosíthatók a neurotoxikus hatással rendelkező vegyi anyagok, ami aztán további alaposabb, ilyen irányú kutatást indokolhat. Mindezek mellett a módszer alapinformációkkal szolgálhat az immunológiai hatásokkal kapcsolatban is.

10. Más szisztémás toxicitási, reprodukciós/fejlődési toxicitási, neurotoxicitási és/vagy immunotoxicitási vizsgálatokból nyert adatok hiányában a pozitív eredmények a veszély kezdeti értékelésére használhatók, illetve hozzájárulnak a további vizsgálatok szükségességére és időzítésére vonatkozó döntésekhez. A vizsgálat különösen hasznosnak bizonyulhat, ha az OECD szűrővizsgálati információs adatkészletének (SIDS) részeként alkalmazzák olyan létező vegyi anyagok értékelésére, amelyekről nem vagy csak csekély mértékben állnak rendelkezésre toxikológiai adatok, továbbá helyettesíthet két különálló vizsgálatot: az OECD 407. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű (e melléklet B.7. fejezetében ismertetett) ismételt dózisú toxicitási vizsgálatot és az OECD 421. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű (e melléklet B.63. fejezetében ismertetett) reprodukciós/fejlődési toxicitási vizsgálatot. Használható ezenkívül szélesebb körű reprodukciós/fejlődési vizsgálatok dózistartomány-kereső vizsgálataként és egyéb releváns esetekben.

11. Általában feltételezhető, hogy érzékenység tekintetében különbségek vannak a vemhes és nem vemhes állatok között. Következésképpen a két vizsgálat különkülön történő elvégzéséhez képest e kombinált vizsgálat keretében bonyolultabb lehet meghatározni olyan dózisokat, amelyek egyaránt alkalmasak az általános szisztémás toxicitás és a specifikus reprodukciós/fejlődési toxicitás felmérésére. Emellett előfordulhat, hogy az önállóan végzett ismételt dózisú vizsgálathoz viszonyítva a vizsgálati eredmények nehezebben értelmezhetők az általános szisztémás toxicitás szempontjából, különösen akkor, ha a vizsgálat során nem egy időben értékelik a szérumra és a kórszövettanra vonatkozó paramétereket. A

▼M8

kombinált szűrővizsgálat összetettebb jellege miatt annak végrehajtása jelentős tapasztalatot kíván a toxicitási vizsgálatok terén. xxxMásfelől viszont – amellett, hogy kevesebb számú kísérleti állat részvételét igényli – a kombinált vizsgálat hatékonyabb eszközt nyújthat a szaporodásra/fejlődésre gyakorolt közvetlen hatásoknak a másodlagos, egyéb (szisztémás) hatásoktól való elkülönítéséhez.

12. Ebben a vizsgálatban az adagolási időszak hosszabb az ismételt dózisú vizsgálat szokásos 28 napos időtartamánál. Ugyanakkor csoportonként mindkét nemből kevesebb állat szükséges a vizsgálathoz ahhoz képest, mint amikor a reprodukciós/fejlődési toxicitási vizsgálat mellett végezik el a hagyományos 28 napos, ismételt dózisú vizsgálatot.

13. Ez a vizsgálati módszer a vizsgálati vegyi anyag orális adagolását feltételezi. Más beadási mód alkalmazása esetén szükség lehet a módszer kiigazítására.

14. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

15. A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

16. A vizsgálati vegyi anyagot fokozatosan növekvő dózisokban kell adagolni hím és nőstény állatok több csoportjának. A hímeket legalább négy hétig kell kezelni, egészen a tervezett leölésüket megelőző napig (ez az időtartam magában foglalja a pároztatást megelőző minimum két hetet, a párzási időszakot, valamint a pároztatást követő mintegy két hetes időszakot). Tekintettel a hímek pároztatást megelőző rövid kezelési időszakára, előfordulhat, hogy a termékenység nem kifejezetten érzékeny mutatója a heretoxicitásnak. Ezért a heréken mindenképpen részletes szövettani vizsgálatot kell végezni. A pároztatást megelőző kéthetes kezelési időszak és az azt követően a párzással/termékenységgel kapcsolatban tett megfigyelések, az összesen legalább négy hétig tartó kezelés, majd a hím ivarmirigyek részletes kórszövettani vizsgálata összességében elegendőnek bizonyulnak ahhoz, hogy kimutatható legyen a hím termékenységre és spermatogenezisre gyakorolt hatások többsége.

17. A nőstényeket a vizsgálat teljes időszaka alatt kezelni kell. Ez magában foglalja a párzást megelőző két hetes időszakot (amelynek célja, hogy lefedjen legalább két teljes ivari ciklust), a fogantatáshoz szükséges változó időtartamot, a vemhesség időszakát, az ellést követő legalább tizenhárom napot és a tervezett elpusztítást megelőző napig tartó további kezelést.

18. Az akklimatizációt és az ivari ciklus kezelés előtti felmérését követően megkezdett vizsgálat időtartama a nőstények teljesítményétől függően megközelítőleg 63 nap [legalább 14 napos pároztatás előtti időszak, (legfeljebb) 14 napos párzási időszak, 22 napos vemhesség és 13 napos szoptatás].

19. Az adagolási időszakban az állatokat a toxicitás jeleinek észlelése érdekében minden nap gondosan megfigyelik. A vizsgálat során elpusztult, illetve leölt állatokat felboncolják, illetőleg a vizsgálat befejezése után a túlélő állatokat is leölik és felboncolják.

▼M8

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

20. Ezt a vizsgálati módszert patkányok használatára tervezték. Ha ebben a 422. vizsgálati iránymutatásban meghatározott paramétereket más rágcsálófajon vizsgálják, a döntést részletesen indokolni kell. A 407. vizsgálati iránymutatás alapján végzett nemzetközi validációs programban a patkány volt az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatására használt egyedüli faj. Nem szabad olyan törzseket alkalmazni, amelyek kevéssé termékenyek vagy amelyekben magas a fejlődési defektusok előfordulási gyakorisága. Korábban vizsgálatban még részt nem vett, egészséges szűz állatokat kell használni. A kísérleti állatokat faj, törzs, nem, súly és kor szerint kell jellemezni. A vizsgálat kezdetén az állatok tömege közötti eltérésnek minimálisnak kell lennie és nem haladhatja meg az ivaronkénti átlag ± 20 %-át. Ha a vizsgálatot egy hosszú távú vagy teljes generáción ál tartó vizsgálat előzetes kísérleteként végzik, ajánlatos mindkét vizsgálathoz ugyanabból a törzsből való, azonos eredetű állatokat használni.

Az állatok tartása és etetése

21. Minden eljárásnak meg kell felelnie a laboratóriumi állatgondozásra vonatkozó helyi szabványoknak. A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérsékletének 22°C-nak (±3 °) kell lennie. A relatív páratartalomnak legalább 30 %-nak kell lennie, és a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgálati vegyi anyaggal való megfelelő keveredés igénye is befolyásolhatja, ha a vizsgálati vegyi anyagot a takarmánnyal adják be.

22. Az állatok azonos nemű egyedekből álló kisebb csoportokban tartandók; ha tudományos szempontból indokolt, az állatok egyedileg is elhelyezhetők. Ketrecben való csoportos elhelyezés esetén egy ketrecben legfeljebb öt állat tartható. A pároztatást erre a célra alkalmas ketrecekben kell végezni. A vemhes nőstényeket egyedileg kell elhelyezni, és el kell látni az alom kialakításához használt (fészeképítő) anyaggal. A szoptató nőstények és utódaik számára külön ketrecet kell biztosítani.

23. Rendszeresen ellenőrizni kell, hogy a takarmány nem tartalmaz-e szennyező anyagokat. A takarmányból egy mintát a jelentés véglegesítéséig meg kell őrizni.

Az állatok előkészítése

24. Az egészséges, fiatal, ivarérett állatokat véletlenszerű kiválasztás útján kell a kezelési csoportokba és ketrecekbe osztani. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek a ketrec elhelyezéséből adódó esetleges hatások. Az állatokat az egyedi azonosíthatóság céljából megjelölik, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig a ketrecükben tartják a laboratóriumi körülményekhez való szoktatás céljából.

A dózisok előkészítése

25. A vizsgálati vegyi anyagot ajánlatos orálisan adagolni, kivéve ha más beadási módot tartanak megfelelőbbnek. Orális adagolás esetén a vizsgálati vegyi anyag beadása általában gyomorszondával történik; a vizsgálati vegyi anyagok azonban beadhatók a takarmánnyal vagy az ivóvízzel is.

26. A vizsgálati vegyi anyagot szükség esetén alkalmas vivőanyagban feloldják vagy szuszpendálják. Lehetőség szerint elsősorban vizes oldatot/emulziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (például kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. Meg kell határozni továbbá azt is, hogy a vizsgálati vegyi anyag mennyire stabil és homogén az adott vivőanyagban.

▼M8

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

27. Az egyes csoportok kiindulási létszámát ajánlatos 10 hím és 12–13 nőstény egyedben meghatározni. Az expozíciót megelőzően felmérik a nőstények ivari ciklusát, és a szokásos 4–5 naptól eltérő időtartamú ciklussal rendelkező állatokat nem használják a vizsgálatban; ezért célszerű néhány plusz nőstényről gondoskodni, hogy végül maradjon csoportonként 10 nőstény. Ha nem mutatkoznak jelentős toxikus tünetek, ezzel a létszámmal várhatóan csoportonként legalább 8 vemhes nőstény biztosítható, ami a vemhes nőstények csoportonkénti elfogadható számának alsó határértéke. A cél az, hogy megfelelő mennyiségű vemhesség és utód jöjjön létre ahhoz, hogy érdemileg fel lehessen mérni a vizsgálati vegyi anyag hatását a termékenységre, a vemhességre, az anyai és a szopási viselkedésre, valamint az F_1 utódnemzedék növekedésére és fejlődésére a fogantatástól az ellést követő 13. napig. Ha időközi leölést terveznek, a csoport létszámát a kísérlet során leölni szándékozott állatok számával meg kell növelni. Meg kell fontolni egy további, ivaronként öt állatból álló kísérő csoport alkalmazását a kontrollcsoportban és a legnagyobb adaggal kezelt csoportban, amelyen a kezelés időszakát követően legalább 14 napig megfigyelhető a szisztémás toxikus hatás visszafordíthatósága, tartóssága vagy késleltetett kialakulása. A kísérő csoportba tartozó állatok nem vesznek részt a pároztatásban, ezért nem használhatók a reprodukciós/fejlődési toxicitás értékelésére.

Adagolás

28. Általánosan 3 kezelt csoportot és egy kontrollcsoportot alkalmaznak. Ha nem állnak rendelkezésre megfelelő általános toxikológiai adatok, az alkalmazandó dózisok meghatározása céljából tartománybehatároló vizsgálat végezhető (azonos törzsből való, azonos eredetű állatokon). A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgálati vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Ha a vizsgálati vegyi anyag beadásához vivőanyagot alkalmaznak, a kontrollcsoportnak a vivőanyagból a felhasznált legnagyobb mennyiséget kell kapnia.

29. A dózisok kiválasztásánál figyelembe veszik a toxicitásra és (toxiko)kinetikára vonatkozóan rendelkezésre álló adatokat. Emellett ügyelni kell arra is, hogy érzékenység tekintetében különbségek lehetnek a vemhes és nem vemhes állatok között. A legmagasabb dózist úgy kell kiválasztani, hogy az toxikus tüneteket keltsen, de ne okozzon halált vagy nyilvánvaló szenvedést a kísérleti állatoknak. Ezután az adagokat fokozatosan csökkentik, azzal a céllal, hogy kimutassák az adagolási szinttől függő hatásokat, illetve a legalacsonyabb adagolási szinten a káros hatások hiányát. Sokszor bizonyul optimálisnak a kettő–négyszeres intervallum alkalmazása, a nagyon nagy intervallumok (pl. több mint 10-szeres szorzófaktor) alkalmazása helyett pedig gyakran célszerű egy negyedik vizsgálati csoportot beiktatni.

30. Ha általános toxicitást (például testsúlycsökkenést, a májra, a szívre, a tüdőre vagy a vesére kifejtett hatásokat stb.) vagy egyéb, nem feltétlenül toxikus reakcióra utaló változásokat (például csökkent táplálékfogyasztást, májmegnagyobbodást) figyelnek meg, az endokrin rendszer szempontjából érzékeny végpontok tekintetében megfigyelt hatások értelmezésekor óvatosan kell eljárni.

Határérték-vizsgálat

31. Ha egy egyetlen, legalább 1 000 mg/testtömeg-kg/nap orális dózis felhasználásával végzett, vagy táplálékkal vagy ivóvízzel történő beadás esetén a táplálékban vagy ivóvízben ezzel egyenértékű (a testsúly alapján végzett számításokon alapuló) százalékos arány alkalmazásával történő és az itt ismertetett eljárások szerint lefolytatott vizsgálat nem idéz elő észlelhető toxikus hatást, és ha a szerkezet tekintetében rokon anyagokra vonatkozó adatok alapján nem

▼M8

is várható a toxicitás bekövetkezése, a teljes, több dózist átfogó tanulmány elvégzése szükségtelennek tekinthető. A határérték-vizsgálat alkalmazandó, kivéve, ha az emberi expozíció ennél nagyobb adagolási szint használatát indokolja. Más típusú beadási módok, így például inhalálás vagy dermális alkalmazás esetén a vizsgálati vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságai gyakran előre jelezhetik az expozíció lehetséges maximumát.

A dózisok beadása

32. Az állatoknak a vizsgálati vegyi anyagot heti hét napon át, naponta adagolják. Ha a vizsgálati vegyi anyagot szondán át adagolják, lehetőleg egyetlen adagban kell gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át beadni. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. A térfogat nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömegarányt, kivéve vizes oldatok esetében, amikor 2 ml/100 g testtömegarány is alkalmazható. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy korrozív vizsgálati vegyi anyagok kivételével a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgálati vegyi anyag mennyiségének változásait, hogy a mennyiség valamennyi dózisnál konstans legyen.

33. A takarmánnyal vagy ivóvízzel adagolt vizsgálati vegyi anyagok esetében fontos annak biztosítása, hogy a vizsgálati vegyi anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt vagy a vízháztartás egyensúlyát. Ha a vizsgálati vegyi anyagot a táplálékkal együtt adják be, vagy állandó koncentrációban (ppm) keverik be, vagy az állat testsúlyától függő, állandó nagyságú dózisban adagolják; a kiválasztott alternatívát meg kell nevezni. A gyomorszondával bejuttatott vizsgálati vegyi anyagok esetében a dózist mindig a nap hasonló időszakában kell beadni, és legalább hetente újra be kell állítani ahhoz, hogy az állat testtömegéhez viszonyítva állandó értéken lehessen tartani. Ha a kombinált vizsgálatot egy hosszan tartó vagy teljes generáción át tartó toxicitási vizsgálat előkísérleteként végzik, a két vizsgálatban azonos étrendet alkalmaznak.

A kísérleti program

34. Az adagolást mindkét ivar esetében 2 héttel a pároztatás előtt el kell kezdeni, miután az állatok legalább öt napon keresztül akklimatizálódtak, és (egy kéthetes kezelés előtti időszak során) ellenőrizték, hogy a nőstények ivari ciklusa megfelel-e a normál ciklusidőnek. A vizsgálatot úgy kell időzíteni, hogy az ivari ciklus értékelése röviddel a teljes ivarérettség elérését követően megkezdődjön. Ez az egyes laboratóriumokban használt különféle patkánytörzsek függvényében némileg változó, a Sprague-Dawley törzsbe tartozó patkányok esetében például 10 hetes korukban, a Wistar-törzsbe tartozók esetében pedig 12 hetes korukban következik be. Az utódokkal rendelkező anyaállatokat az ellést követő 13. napon vagy röviddel azután el kell pusztítani. Annak érdekében, hogy a vérvétel előtti éjszaka koplaljanak az anyaállatok (ha ez a kiválasztott módszer), nem feltétlenül szükséges ugyanazon a napon elpusztítani az anyaállatot és utódait. A születés napja (vagyis amikor lezárul az ellés) a post-partum 0. napja. Azokat a nőstényeket, amelyek semmi jelét nem mutatják annak, hogy párosodtak volna, a párzási időszak utolsó napját követő 24–26 nappal el kell pusztítani. Az adagolást a párzási időszakban sem szabad abbahagyni egyik nem esetében sem. A hímeket a párzási időszakot követően továbbra is kezelni kell, legalább a minimális, 28 napos adagolási időszak végéig. Ezt követően leölik, vagy ha úgy ítélik megfelelőnek, megtartják azokat, és egy esetleges második pároztatás céljából tovább folytatják kezelésüket.

35. Az anyaállatok napi szintű kezelését folytatni kell a vemhesség teljes időszakán át egészen a post-partum 13. napjáig vagy az elpusztításukat megelőző napig. Azon vizsgálatoknál, amelyek keretében a vizsgálati vegyi anyagot inhalálás vagy dermális alkalmazás útján adják be, a kezelést folytatni kell legalább a vemhesség 19. napjáig, majd a lehető leghamarabb, de legkésőbb a 4. posztnatális napon (PNN) újra kell kezdeni.

▼M8

36. Amennyiben vizsgálatot követő megfigyelés céljából létrehoztak kísérő csoportot, a csoportba tartozó állatok nem vesznek részt a pároztatásban. Ezeket az állatokat az anyaállatok első tervezett leölését követően még legalább 14 napig tartják kezelés nélkül, hogy megfigyeljék a toxikus hatások késleltetett előfordulását, fennmaradását vagy visszafordíthatóságát.

37. A kísérleti ütemterv ábráját a 2. függelék tartalmazza.

Ivari ciklus

38. A kezelés megkezdése előtt ellenőrizni kell az ivari ciklust, hogy szabályos ciklussal rendelkező nőstények kerüljenek kiválasztásra a vizsgálathoz (lásd a 27. pontot). Emellett napi szinten kell vizsgálni a hüvelyi kenetet is, a kezelési időszak kezdetétől mindaddig, amíg be nem bizonyosodik, hogy megtörtént a párzás. Ha felmerül a lehetősége annak, hogy az adagolás megkezdése olyan akut stresszhatást idéz elő, amely módosíthatja az ivari ciklust, a laboratóriumok eljárhatnak úgy is, hogy két hétig kezelik a vizsgálati állatokat, majd a pároztatás előtti időszakban legalább két hétig naponta hüvelyi kenetet vesznek az ivari ciklus ellenőrzéséhez, amelyet a párzási időszak során is folyamatosan figyelemmel kísérnek egészen a párzás megtörténtéig. A hüvelyi/méhnyaki sejtvétel során ügyelni kell arra, hogy meg ne sérüljön a nyálkahártya, mert az álvemhességet idézhet elő (8) (9).

A pároztatási eljárás

39. Rendes esetben e vizsgálat során 1:1 (egy hím-egy nőstény) pároztatást kell alkalmazni. Ettől abban az esetben lehet eltekinteni, ha a hímek közül elpusztul valamelyik. A nőstényt egy adott hímmel kell összerakni, és addig kell együtt hagyni azokat, amíg meg nem győződtek a párzás megtörténtéről, vagy 2 hét el nem telik. Minden reggel meg kell vizsgálni, hogy a nőstényben észlelhető-e sperma vagy a hüvelydugó. A vemhesség 0. napja definíció szerint az a nap, amikor a párosodás tényét megerősítették (hüvelydugó vagy sperma figyelhető meg a nőstényben). Ha a pároztatás sikertelen volt, fontolóra lehet venni a nőstények újrapároztatását egy azonos csoportbeli és már sikeresen pároztatott hímmel.

Az alom mérete

40. Az ellés utáni negyedik napon az egyes almok egyedszáma a létszám fölötti kölykök véletlenszerű eltávolításával módosítható, hogy almonként az eredmény – amennyire lehetséges – a használt patkánytörzsre jellemző ivaronkénti négy vagy öt utód legyen. Két létszám feletti kölyöktől vérmintát kell venni, egybe kell gyűjteni és fel kell használni a T4 szérumszintek meghatározásához. A kölykök szelektív, például a testtömeg vagy az anogenitális távolság (AGD) alapján történő eltávolítása nem elfogadható. Ha a hím és nőstény utódok száma nem teszi lehetővé a nemenként négy vagy öt azonos nemű utódot tartalmazó almok kialakítását, részleges kiegyenlítés is elfogadható (például hat hím és négy nőstény). Amennyiben az alom egyedszáma a selejtezési célérték (almonként 8 vagy 10 utód) alá csökkenne, nem kell eltávolítani kölyköket. Ha az alom mérete csupán eggyel haladja meg a selejtezési célértéket, csak egy kölyköt távolítanak el, és attól vesznek vért a T4 szérumszintek esetleges értékelésekhez.

41. Ha nem igazítják ki az alom egyedszámát, az ellést követő 4. napon almonként két kölyköt elpusztítanak, és vérmintát vesznek tőlük a pajzsmirigyhormonok szérumkoncentrációjának méréséhez. Lehetőség szerint az almonkénti két kölyök nőstény legyen, hogy maradjanak hímek az emlőbimbó-visszamaradás megállapításához, kivéve abban az esetben, ha a nőstény utódok eltávolítása miatt nem maradna nőstény a vizsgálat végi értékeléshez. Amennyiben az egyedszám az almonkénti 8 vagy 10 utód alá esne (a használt patkánytörzsre jellemző szokásos alommérettől függően), nem kell eltávolítani kölyköket. Ha az alom egyedszáma csupán eggyel haladja meg az alom szokásos méretét, csak egy kölyköt távolítanak el, és attól vesznek vért a T4 szérumszintek esetleges értékelésekhez.

▼M8

Megfigyelések

42. Naponta legalább egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban általános klinikai megfigyelést kell végezni, figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Fel kell jegyezni a kísérleti állatok klinikai állapotát. Naponta legalább kétszer meg kell vizsgálni az összes állatot morbiditás és mortalitás szempontjából.

43. Az első expozíció előtt egyszer (az egyedek közötti összehasonlítás érdekében), azt követően pedig legalább hetente egyszer az összes szülőt részletes klinikai vizsgálatoknak kell alávetni. E megfigyeléseket azokon a ketreceken kívül, ahol egyébként tartják őket, lehetőleg egy szabványos karámban, minden alkalommal a nap hasonló időszakában végzik el. A megfigyeléseket gondosan feljegyzik; lehetőleg a vizsgálatot végző laboratórium által meghatározott pontozásos rendszer segítségével. Törekedni kell arra, hogy minimálisak legyenek a kísérleti körülmények közötti eltérések, és hogy a megfigyeléseket lehetőleg olyan megfigyelők végezzék, akik nem tudnak a kezelésről. A feljegyzett észleléseknek ki kell terjedniük többek között a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapota, a váladékok és kiválasztott anyagok előfordulása, valamint az autonóm aktivitás (például könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupillaméret, szokatlan légzési ritmusok) tekintetében megfigyelhető változásokra. A járás, a testtartás és a kézbevételre adott reakció megváltozását, valamint a klónusos vagy tónusos görcsök, sztereotip viselkedés (például túlzott mosdás, megkergülés), az elhúzódó vagy nehéz ellés, illetve bármilyen bizarr viselkedésmód (például öncsonkítás, hátrafelé járás) megfigyelt eseteit is fel kell jegyezni (10).

44. A vizsgálat során egy alkalommal minden csoportból véletlenszerűen kiválasztott öt hímen és öt nőstényen meg kell figyelni a különféle (pl. hallószervi, vizuális, proprioceptív) ingerekre adott szenzoros reaktivitást (8) (9) (11), meg kell mérni a fogóerőt (12) és értékelni kell a motoros aktivitást (13). A követendő eljárásokkal kapcsolatban további részletek a vonatkozó szakirodalomban találhatók. Ettől függetlenül a hivatkozottaktól eltérő alternatív eljárások is alkalmazhatók. A hímek esetében ezeket a funkcionalitási megfigyeléseket az adagolási időszak vége felé, röviddel tervezett leölésük előtt, de még a hematológiai és klinikai kémiai célú vérvételt megelőzően kell elvégezni (lásd az 53–56. pontot és az 1. lábjegyzetet). A nőstényeknek fiziológiai szempontból hasonló állapotban kell lenniük a funkcionalitási vizsgálatok során, ezért célszerű vizsgálatukat röviddel tervezett leölésük előtt, a szoptatás utolsó hetében elvégezni (pl. a 6–13. szoptatási napon). Törekedni kell arra, hogy az anyaállatok és kölykeik a lehető legrövidebb ideig legyenek elválasztva egymástól.

45. A vizsgálat vége felé esedékes, egyszeri funkcionalitási megfigyelések elhagyhatók, ha a vizsgálatot egy azt követő (90 napos) szubkrónikus vagy hosszú távú vizsgálat előzetes tanulmányaként végzik. Ebben az esetben a funkcionalitási megfigyeléseket az utóbbi vizsgálat részeként kell elvégezni. Másrészt az ismételt dózisú vizsgálat során végzett funkcionalitási megfigyelések adatainak megléte segítheti az azt követő szubkrónikus vagy hosszú távú vizsgálat során a dózisok kiválasztását.

46. Kivételes esetekben a funkcionalitási megfigyelések elhagyhatók azon csoportoknál is, amelyek egyébként olyan mértékű toxicitási tüneteket mutatnak, hogy az jelentős mértékben megzavarná a funkcionalitási vizsgálat eredményeit.

47. A vemhesség nulladik napjától számítandó terhességi (gesztációs) időszakról feljegyzést kell készíteni. Az ellés után minden almot a lehető leghamarabb meg kell vizsgálni a kölykök számának és ivarának, a halvaszületések, élveszületések és fejletlen egyedek (a megfelelő kontrollcsoportba tartozó kölyköknél jelentősen kisebb utódok) számának, valamint a súlyos rendellenességek jelenlétének megállapításához.

▼M8

48. Az élő kölyköket meg kell számolni, nemüket meg kell állapítani, és az almok egyedeinek súlyát meg kell mérni a születést követő 24 órán belül (a post-partum 0. vagy 1. napján) és legalább a post-partum 4. és 13. napján. A szülőkön végzett (43. és 44. pontban említett) megfigyelések mellett az utódok minden rendellenes viselkedéséről be kell számolni.

49. Az anogenitális távolságot (AGD) minden utódon legalább egy alkalommal meg kell mérni a 0. és 4. posztnatális nap között. A kölykök testtömegét azon a napon kell megmérni, amikor az AGD-t is mérik, és az AGD-t normálni kell a kölykök méretére, ami lehetőleg a testtömeg köbgyöke (14). Az OECD 151. vizsgálati iránymutatásának (15) ajánlása szerint a hím utódok emlőbimbóinak/emlőbimbóudvarainak számát meg kell számolni a 12. vagy 13. posztnatális napon.

Testtömeg és táplálék-/vízfogyasztás

50. A hímek és nőstények testsúlyát meg kell mérni az adagolás első napján, majd ezt követően legalább hetente és a vizsgálat végén meg kell ismételni a mérést. A nőstényeket a vemhesség alatt a 0., 7., 14. és 20. napon kell megmérni, továbbá az ellést követő 24 órán belül (a post-partum 0. vagy 1. napján) és legalább a post-partum 4. és 13. napján. A megfigyeléseket minden egyes felnőtt állat esetében külön-külön kell rögzíteni.

51. A pároztatás előtt, valamint a vemhesség és a szoptatás ideje alatt a takarmányfogyasztást legalább hetente kell mérni. A párzási időszak során nem kell feltétlenül mérni a takarmányfogyasztást. Ha a vizsgálati vegyi anyagot az ivóvízzel adagolják, ezen időszakok során a vízfogyasztást is mérni kell.

Hematológia

52. A vizsgálat során egy alkalommal minden csoportból véletlenszerűen kiválasztott öt hímen és öt nőstényen el kell végezni az alábbi hematológiai vizsgálatokat: hematokrit, hemoglobin koncentrációk, vörösvértestszám, retikulocitaszám, leukocitaszám (teljes és differenciált vérkép), trombocitaszám és a véralvadási idő/képesség mérése. Ha a vizsgálati vegyi anyagról vagy annak vélt metabolitjairól ismert vagy feltételezhető, hogy oxidáló tulajdonságokkal rendelkeznek, az említett vizsgálatokon kívül többek között a methemoglobin-koncentrációt és a Heinz-testek előfordulását is meg kell határozni.

53. A vérmintákat egy megnevezett helyről kell levenni. A nőstényeknek fiziológiai szempontból hasonló állapotban kell lenniük a vérvétel során. A vemhesség kialakulásának eltérő időpontjából adódó gyakorlati nehézségek elkerülése érdekében a nőstényektől a pároztatás előtti időszak végén is vehető vérminta ahelyett, hogy közvetlenül az állatok elaltatása előtt vagy az elaltatási folyamat részeként vennék le a mintát. A hímektől viszont célszerű közvetlenül az állatok végleges elaltatása előtt vagy az elaltatási folyamat részeként vérmintát venni. Alternatív megoldásként a hímektől is vehető vér a pároztatás előtti időszak végén, amennyiben a nőstények esetén is ez az időpont került kiválasztásra.

54. A vérmintákat megfelelő feltételek mellett kell tárolni.

Klinikai biokémiai vizsgálatok

55. A szövetekben jelentkező fontosabb toxikus hatások és különösen a vesékre és a májra gyakorolt hatás vizsgálata érdekében a klinikai biokémiai értékek meghatározását az egyes csoportokból kiválasztott öt hím és öt nőstény

▼M8

vérmintáján végzik el. A vérvétel előtti éjszaka ajánlatos az állatokat koplaltatni ([1]). A vérplazma- és vérszérum-meghatározások során vizsgálandó elemek: nátrium, kálium, vércukor, összkoleszterin, karbamid, kreatinin, összprotein és albumin, továbbá legalább két, a májsejti hatásokat jelző enzim (pl. alanin-aminotranszferáz, aszpartát-aminotranszferáz és szorbitol dehidrogenáz) és epesavak. Bizonyos körülmények között hasznos információk nyerhetők további (májból vagy máshonnan származó) enzimek, valamint a bilirubin méréséből.

56. Vérmintákat egy meghatározott helyről kell venni, az alábbi ütemezés szerint:

— almonként legalább két kölyöktől a születést követő 4. napon, amennyiben azt az utódok száma lehetővé teszi (lásd a 40–41. pontot),

— az összes anyaállattól és almonként legalább két kölyöktől a vizsgálat végét jelentő 13. napon, és

— az összes felnőtt hímtől a vizsgálat végén.

A vérmintákat megfelelő körülmények között tárolják. A 13 napos utódoktól és a felnőtt hímektől vett vérminták alapján értékelik a pajzsmirigyhormon (T4) szérumszinteket. Szükség esetén a T4 további értékeléséhez felhasználhatók az anyaállatoktól és a 4 napos utódoktól vett vérminták. Ha a vizsgálat szempontjából lényeges, más hormonok is mérhetők. A pajzsmirigyhormon analízisekhez almonként egyesíteni lehet a kölyköktől vett vérmintákat. A pajzsmirigyhormonokra (T4 és TSH) vonatkozó mérésekhez lehetőleg a teljes vérmintát kell használni.

57. Kiegészítésként, a vizsgálat utolsó hetében, amikor a vizeletet előre meghatározott időpontokban gyűjtik, az alábbi vizeletminta-vizsgálatokat lehet elvégezni az egyes csoportokból véletlenszerűen kiválasztott öt hím tekintetében: megjelenés, mennyiség, ozmolalitás vagy fajsúly, pH-érték, fehérjék, glukóz és vér/vérsejtek.

58. Ezeken túlmenően megfontolható az általános szöveti roncsolódás szérummarkereinek vizsgálata. Más vizsgálatokat is elvégeznek, ha a vizsgálati vegyi anyagnak ismert vagy feltételezhető hatása van a kapcsolódó anyagcsere-folyamatokra; ilyen pl. a kalcium, a foszfát, éhgyomorra mért triglicerid és glukóz, egyes hormonok, a methemoglobin és a kolinészteráz mérése. Ezeket eseti alapon kell meghatározni.

59. A hormonok meghatározásának variabilitását és az azzal kapott abszolút koncentrációt az alábbi tényezők befolyásolhatják:

— az elpusztítás időpontja, tekintettel a hormonkoncentrációk nap folyamán tapasztalható ingadozására,

([1]) Bizonyos szérum- és a plazmavizsgálatok, főleg a glükóz meghatározása esetén ajánlatos a vizsgálat előtti éjszaka koplaltatni az állatokat. Ennek fő indoka az, hogy a vizsgálatokat megelőző koplaltatás mellőzése szükségszerűen növelné a kapott eredmények variabilitását, ami így megnehezítené a kevésbé jellegzetes hatások felismerését és értelmezését. Más oldalról megközelítve a kérdést, azt is el kell ismerni, hogy az éjszakai koplaltatás befolyásolja a (vemhes) állatok rendes anyagcseréjét, zavarólag hat a szoptatási és gondozási viselkedésre, és különösen azon vizsgálatok esetében, ahol a vizsgálati vegyi anyagot a táplálékkal adagolják, és zavarhatja a vizsgálati vegyi anyaggal való napi kezelést. Ha az éjszakai koplaltatás mellett döntenek, a klinikai biokémiai paramétereket a hímekkel végzett vizsgálat negyedik hetében, a funkcionális megfigyeléseket követően kell meghatározni. Az anyaállatokat a kölykök például 13. posztnatális napon történő eltávolítását követően még egy további napig meg kell tartani. Az anyaállatokat a szoptatás 13–14. napjától koplaltatni kell éjszakánként, és a leöléskor levett vérmintájukat kell felhasználni a klinikai kémiai paraméterek meghatározásához.

▼M8

— az állatot érő indokolatlan stressz elkerülése érdekében alkalmazott elpusztítási mód, amely hatással lehet a hormonkoncentrációkra,

— a hormonmeghatározásokhoz alkalmazott, standard görbéjük tekintetében esetlegesen eltérő vizsgálati készletek.

60. A kifejezetten hormon-meghatározási célra szánt plazmamintákat a nap hasonló időpontjában kell gyűjteni. A kereskedelmi fogalomban kapható különböző vizsgálati készletek eltérő számszerű értékeket adnak a hormonkoncentrációk elemzése során.

61. Ha a rendelkezésre álló kiinduló adatok nem bizonyulnak elegendőnek, megfontolandó a hematológiai és klinikai biokémiai változók meghatározása az adagolás kezdete előtt, lehetőség szerint az állatok egy, a kísérleti csoportokba nem tartozó csoportjánál. Nőstények esetében az adatok szoptató anyaállatokról kell származzanak.

PATOLÓGIA

Makroszkópos boncolás

62. A vizsgálatokba bevont összes ivarérett állatot teljes körű, beható autopsziának kell alávetni, ideértve a következők alapos vizsgálatát: a test külső felszíne, az összes testnyílás, a koponya, a mellüreg, a hasüreg és ezek tartalma. Külön figyelmet kell szentelni a szaporítószerveknek. A beágyazódási helyek számát fel kell jegyezni. A boncolás napján meg kell vizsgálni a hüvelyi kenetet az ivari ciklus aktuális szakaszának meghatározásához, hogy lehetővé váljon a korreláció felállítása a női szaporítószervek kórszövettanával.

63. Az összes hím felnőtt állat heréit és mellékheréit, prosztatáját és ondóhólyagjait a koaguláló mirigyekkel egy egységként meg kell tisztítani minden rátapadt szövettől, és a kiszáradás megelőzése érdekében a boncolást követően a lehető legrövidebb időn belül meg kell mérni nedves tömegüket. Ezen túlmenően további szervtömegmérések végezhetők hímeknél a végbélemelő és a bulbocavernosus izomra, a Cowper-mirigyekre és a glans penisre, nőstényeknél a páros petefészekre (nedves tömeg) és a méhre (valamint a méhnyakra) kiterjedőleg; ha ezeket a szerveket is bevonják a mérésbe, tömegüket a boncolás után lehető leghamarabb meg kell határozni. Meg kell őrizni az összes felnőtt állat petefészkeit, heréit, mellékheréit, a járulékos ivarszerveket, valamint a makroszkópikus léziókat mutató szerveket.

64. Ezenfelül a későbbi tervezett kórszövettani vizsgálatok szempontjából leginkább megfelelő fixálószerben meg kell őrizni valamennyi felnőtt hím és nőstény, továbbá minden alomból egy hím és egy nőstény 13 napos kölyök pajzsmirigyét. A pajzsmirigy súlya a fixálást követően is meghatározható. A megtisztítás a szövetkárosodás elkerülése érdekében ez esetben is igen óvatosan, kizárólag a fixálást követően végzendő el. A szövetkárosodás veszélyeztetheti a kórszövettani elemzést. A vérmintákat egy megnevezett helyről kell venni, közvetlenül az állatok végleges elaltatása előtt vagy aközben, és azokat megfelelő körülmények között kell tárolni (lásd a 56. pontot).

▼M8

65. Ezen túlmenően (a haldokló és/vagy a vizsgálat vége előtt elaltatott egyedeken kívül) minden csoportból véletlenszerűen kiválasztott legalább öt felnőtt hím és nőstény máját, veséit, mellékveséit, csecsemőmirigyét, lépét, agyát és szívét megtisztítják minden rátapadt szövettől, és a kiszáradás megelőzése érdekében a boncolást követő lehető legrövidebb időn belül megmérik nedves tömegüket. Az alábbi testszöveteket konzerválni kell a szövetek típusa és a szándékolt későbbi kórszövettani vizsgálatok szempontjából legmegfelelőbb fixálószerben: szövetet, amelyen van makroszkopikus lézió, az agyat (jellemző részeket, mint pl. a nagyagy, a kisagy, a nyúltagyi híd), a gerincvelőt, a szemet, a gyomrot, a vékony- és vastagbelet (beleértve a Payer-plakkot), a májat, a veséket, a mellékveséket, a lépet, a szívet, a csecsemőmirigyet, a légcsövet és a tüdőket (utóbbit először megtöltik fixálószerrel, és úgy merítik alá), az ivarmirigyeket (heréket és petefészkeket), a járulékos nemi szerveket (a méhet és a méhnyakat, a mellékheréket, a prosztatát és az ondóhólyagokat a koaguláló mirigyekkel), a hüvelyt, a húgyhólyagot, a nyirokcsomókat (a legközelebbi elvezető nyirokcsomó mellett a laboratórium tapasztalata alapján másik nyirokcsomót is vételezni kell (16)), a perifériás idegeket (csípő vagy sípcsont környéki), lehetőleg az izomzathoz közeli helyről véve, a vázizomzatot és csontot a csontvelővel együtt (metszetet és/vagy egy, friss csontvelőből felszívott mintát). A herék fixálását javasolt Bouin- vagy módosított Davidson-féle fixálószerbe merítéssel végezni (16) (17) (18); e szövetek esetében formalinos fixálás használata nem ajánlott. A tunica albugineán a fixálószer gyors bejutása érdekében tűvel óvatosan sekély szúrást lehet ejteni a szerv mindkét végén. A klinikai és más jellegű megfigyelések alapján további testszövetek vizsgálata is szükséges lehet. A fentieken túl meg kell őrizni minden olyan más szervet is, amely a vizsgálati vegyi anyag ismert tulajdonságai alapján valószínűleg célszervnek tekinthető.

66. Az alábbi szövetek értékes információkat nyújthatnak az endokrin rendszerre gyakorolt hatásokról: ivarmirigyek (petefészkek és herék), járulékos ivarszervek (méh és méhnyak, mellékherék, ondóhólyagok a koaguláló mirigyekkel, a prosztata dorzolaterális és ventrális része), hüvely, agyalapi mirigy, hím emlőmirigy és mellékvese. A hím emlőmirigyek elváltozásairól nem áll rendelkezésre kellő dokumentáció, azonban ez a paraméter igen érzékeny lehet az ösztrogénhatású anyagokra. A 65. pontban nem szereplő szervek/szövetek megfigyelése nem kötelező.

67. Az elhullott és a post-partum 13. napján vagy röviddel azután elpusztított utódokat legalább külsőleg alaposan meg kell vizsgálni, hogy láthatók-e rajtuk súlyos rendellenességek. Különös figyelmet kell szentelni a külső ivarszervek vizsgálatának, és ezen belül a rendellenes fejlődés jeleinek.

Kórszövettan

68. A kontrollcsoport és a magas dózissal kezelt csoport kiválasztott egyedeinek tartósított szerveit és szöveteit teljes kórszövettani vizsgálatnak vetik alá (különös figyelmet fordítva a hím ivarmirigyek spermatogenezisének szakaszaira és a here intersticiális sejtfelépítésének kórszövettanára). Szükség esetén vizsgálni lehet az utódoktól és a fennmaradó felnőtt állatoktól származó pajzsmirigyet. Ha a magas dózissal kezelt csoport egyedei esetében a kezelésnek tulajdonítható elváltozások figyelhetők meg, e vizsgálatokat ki kell terjeszteni más dózissal kezelt csoportok egyedeire is. A kórszövettani iránymutatás (10) további információkat tartalmaz az endokrin szövetek boncolásával, fixálásával, metszeteinek elkészítésével és kórszövettani vizsgálatával kapcsolatban.

69. Minden makroszkopikus léziót meg kell vizsgálni. A NOAEL értelmezéséhez segítséget nyújthat más dózissal kezelt csoportokból származó célszervek vizsgálata, különösen azokból, amelyekben a kezelés állítólag nem járt káros hatással.

▼M8

70. Kísérő csoport használata esetén azon szerveken és szöveteken kell kórszövettani vizsgálatot végezni, amelyeknél a kezelt csoportok egyedei esetében elváltozásokat lehetett kimutatni.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

71. Az állatokra vonatkozóan egyedi adatsorokat kell felvenni. Emellett minden adatot táblázatos formában is össze kell foglalni, amelyben minden egyes vizsgálati csoport esetében fel kell tüntetni az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a vizsgálat során elpusztult vagy humánus okok miatt elaltatott állatok számát, az elhullások és az eutanáziák időpontját, a termékeny állatok számát, a vemhes nőstények számát, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ezen belül bármely toxikus tünet megjelenésének időpontját, valamint ezek időtartamát és súlyosságát, a kórszövettani elváltozások típusait és az almokra vonatkozó minden idevágó adatot. A 3. mellékletben közzéteszünk egy, a reprodukciós/fejlődési hatások értékelése során nagyon hasznosnak bizonyult, táblázatos formájú összefoglaló jelentést.

72. A számszerű eredményeket lehetőség szerint megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazásával kell kiértékelni. A hatás dózistartomány mentén történő összehasonlításaival kiküszöbölhető a több t-próba alkalmazása. A statisztikai módszereket a vizsgálat tervezésekor kell megválasztani. Az anogenitális távolság és az emlőbimbó-visszamaradás statisztikai elemzésének az utódokra vonatkozó egyedi adatokon kell alapulnia, ugyanakkor figyelembe kell vinni az alom által gyakorolt hatásokat. Ahol megfelelő, az elemzés egysége az alom. A kölykök testsúlyára vonatkozó statisztikai elemzésnek a kölykök egyedi adatain kell alapulnia, ugyanakkor figyelembe kell vinni az alom által gyakorolt hatásokat. A vizsgálat korlátozott terjedelme miatt a „szignifikancia” felmérésére szolgáló vizsgálatok formájában végzett statisztikai elemzések számos végpont, különösen a reprodukciós végpontok szempontjából csekély jelentőséggel bírnak. A legelterjedtebb módszerek némelyike – különösen a központi érték mérésére szolgáló paraméteres próbák – nem megfelelők. Amennyiben statisztikai elemzésekre támaszkodnak, még a vizsgálat megkezdése előtt olyan módszert kell választani, amelyik megfelel a vizsgált változók eloszlásának.

Az eredmények értékelése

73. E toxicitási vizsgálat eredményeit a megfigyelt hatások, valamint a boncolási és mikroszkópos eredmények szempontjából kell értékelni. Az értékelés során ki kell térni a vizsgálati vegyi anyag dózisa és a rendellenességek, ezen belül a súlyos léziók, az azonosított célszervek, a terméketlenség, a klinikai rendellenességek, a csökkent reproduktív teljesítmény és egyedszám, a testtömegváltozások, a mortalitásra gyakorolt hatások és egyéb toxikus hatások megléte vagy hiánya, illetve gyakorisága és súlyossága közötti összefüggésekre.

74. A hímek rövid kezelési időszaka miatt a hímekre gyakorolt reprodukciós hatások felmérése során figyelembe kell venni a herék és mellékherék kórszövettanát, valamint a termékenységre vonatkozó adatokat. A szaporodásra/fejlődésre (pl. alomméretre, anogenitális távolságra, emlőbimbó-visszamaradásra, T4 szérumszintekre) vonatkozólag rendelkezésre álló korábbi kontrolladatok szintén hasznos segítséget nyújthatnak a vizsgálat értelmezéséhez.

75. A minőség-ellenőrzéshez javasolt történeti kontrolladatokat gyűjteni, a számszerű adatokhoz pedig kiszámítani a variációs együtthatót, különösen az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatásával összefüggő paraméterek tekintetében. Ezek az adatok felhasználhatók összehasonlítási célokra a tényleges vizsgálatok kiértékelése során.

▼M8

Vizsgálati jelentés

76. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

— eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

Vivőanyag (ha van):

— a vivőanyag kiválasztásának indokolása, ha az nem víz.

Kísérleti állatok:

— használt faj/törzs;

— az állatok száma, kora és neme;

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.;

— az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetekor;

— patkánytól eltérő faj alkalmazásának indokolása.

Vizsgálati körülmények:

— a dózisok kiválasztásának indokolása;

— a vizsgálati vegyi anyag formulázásával/a takarmány előkészítésével, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenitásával kapcsolatos adatok;

— a vizsgálati vegyi anyag beadására vonatkozó részletek;

— átszámítás a vizsgálati vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/kg testsúly/nap), ha ez alkalmazható;

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek;

— a selejtezés során a kölykök kiválasztására használat randomizálási eljárás részletes leírása, ha sor került selejtezésre.

Eredmények:

— testsúly és annak változásai;

— táplálék- és vízfogyasztásra vonatkozó adatok, ha alkalmazható;

▼**M8**

— a toxikus reakciók adatai nemenként és dózisonként, beleértve a termékenységet, a gesztációs időt és a toxicitás egyéb

— tüneteit is;

— a vemhesség időtartama; a szaporodásra, az utódokra, a posztnatális növekedésre stb. gyakorolt toxikus vagy egyéb hatások;

— a klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (a változások visszafordíthatók-e vagy sem);

— az érzékszervi aktivitás, a szorítási erősség és a motoros aktivitás értékelése;

— hematológiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel;

— a klinikai biokémiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel;

— normális vagy abnormális ivari ciklust mutató felnőtt nőstények száma és a ciklus időtartama;

— az élveszületések száma és a beágyazódás utáni veszteség;

— a szemmel látható rendellenességeket mutató kölykök száma; a külső nemi szervek makroszkopikus értékelése, a fejletlen utódok száma;

— a vizsgálat során bekövetkezett elhullás ideje, illetve hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét;

— a beágyazódások száma, az alomméret és az almokban lévő egyedek méréskor rögzített testsúlya;

— utódok testsúlyadatai;

— az összes utód anogenitális távolsága (és az AGD-mérés napján rögzített testsúlyuk);

— emlőbimbó-visszamaradás a hím utódoknál;

— pajzsmirigyhormonok szintje 13 napos kölyköknél és felnőtt hímeknél (az anyaállatoknál és 4 napos kölyköknél, ha mérték);

— a testtömeg az elpusztításkor, valamint a szülők szervtömegadatai;

— boncolási eredmények;

— a kórszövettani leletek részletes ismertetése;

— felszívódási adatok (ha vannak);

— adott esetben az eredmények statisztikai feldolgozása.

Az eredmények értékelése.

Következtetések

▼M8

Az eredmények értelmezése

77. Ez a vizsgálat az ismételt dózisok útján történő kezeléssel összefüggésben kimutatható reprodukciós/fejlődési toxicitás értékelésére szolgál. Különösen mivel mind az általános toxicitási, mind a reprodukciós/fejlődési végpontokra hangsúlyt fektetnek, a vizsgálat eredményei lehetővé teszik az általános toxicitás hiányában is fellépő reprodukciós/fejlődési hatások megkülönböztetését azoktól, amelyek csak a szülőkre is toxikus szintek mellett fejeződnek ki (lásd a 7–11. pontot). Jelezheti a további vizsgálatok szükségességét, és iránymutatást nyújthat a későbbi vizsgálatok kialakításához. A szaporodási és fejlődési eredmények értelmezésével kapcsolatban az OECD 43. iránymutatását kell alkalmazni (19). A rágcsálókon végzett endokrin és reprodukciós vizsgálatok szövettani értékeléséről szóló 106. OECD-iránymutatás (16) olyan információkkal szolgál az (endokrin) szervek és a hüvelyi kenet előkészítéséről és értékeléséről, amelyek segítséget nyújthatnak e vizsgálati módszerhez.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Kérésre elérhető a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezetnél, Párizs

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Kérésre elérhető a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezetnél, Párizs

(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, kérésre elérhető a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezetnél, Párizs

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

▼**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). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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) Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol*. 30, 524-533.

(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

▼**M8**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK (LÁSD MÉG AZ OECD 150. IRÁNYMUTATÁSÁT (20))

Androgenitás egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében természetes androgén hormonokhoz (például a tesztoszteronhoz) hasonló hatást fejtsen ki.

Antiandrogenitás egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes androgén hormonok (például a tesztoszteron) hatását gátolja.

Antiösztrogenitás egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes ösztrogén hormonok (például a 17ß-ösztradiol) hatását gátolja.

Antitiroid hatás egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes pajzsmirigyhormon (például a T_3) hatását gátolja.

Vegyi anyag anyag vagy keverék.

Fejlődési toxicitás reprodukciós toxicitás kifejeződése az utódokban pre-, peri-, posztnatális, szerkezeti vagy funkcionális rendellenességek formájában.

Dózis a vizsgálati vegyi anyag beadott mennyisége. A dózist a vizsgálati vegyi anyag súlyának és a kísérleti állat egységnyi testsúlyának napi hányadosaként (például mg/testsúlykilogramm/nap), vagy a takarmányban lévő állandó koncentrációként fejezik ki.

Adagolás általános fogalom, amely a dózist, valamint az adagolás gyakoriságát és időtartamát foglalja magában.

Nyilvánvaló toxicitás általános fogalom, amely a toxicitás vizsgálati vegyi anyag beadását követően kialakuló egyértelmű tüneteire vonatkozik. E tüneteknek elegendőnek kell lenniük a veszély értékeléséhez, továbbá olyan szintet kell képviselniük, amelynél a beadott dózis növelése várhatóan a toxicitás súlyos jeleinek kialakulásához és valószínű mortalitáshoz vezet.

Termékenységkárosodás a hím vagy női szaporodási funkciók vagy képesség terén jelentkező rendellenességeket jelenti.

Anyai toxicitás a vemhes nőstényeket érő, a vemhességhez kapcsolható káros hatások, amelyek történhetnek specifikusan (közvetlen hatás) vagy nem specifikusan (közvetett hatás).

NOAEL a „no-observed-adverse-effect level” (nem észlelhető káros hatásszint) rövidítése. Ez a legmagasabb dózis, amelynél még nem figyelhetők meg a kezelés okozta káros hatások.

Ösztrogenitás egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes ösztrogén hormonokhoz (például a 17ß-ösztradiolhoz) hasonló hatást fejtsen ki.

Reprodukciós toxicitás az utódoknál jelentkező káros hatásokat és/vagy a hím vagy női szaporodási funkciók vagy képesség csökkenését jelenti.

Vizsgálati vegyi anyag: az e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

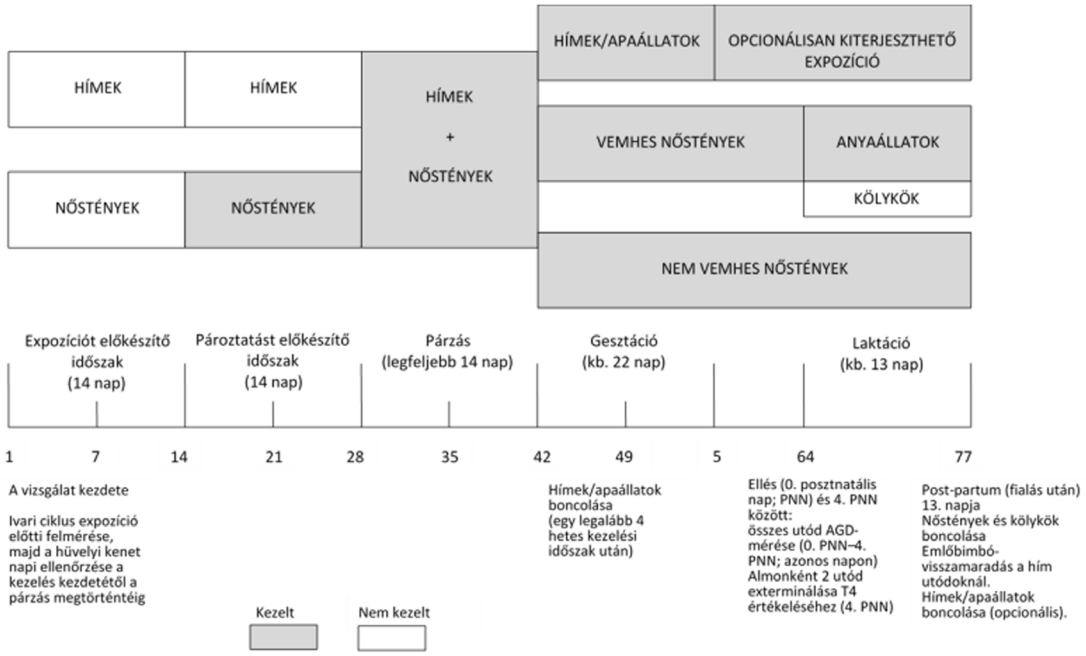
Tiroid hatás egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes pajzsmirigyhormonhoz (például a T_3-hoz) hasonló hatást gyakoroljon.

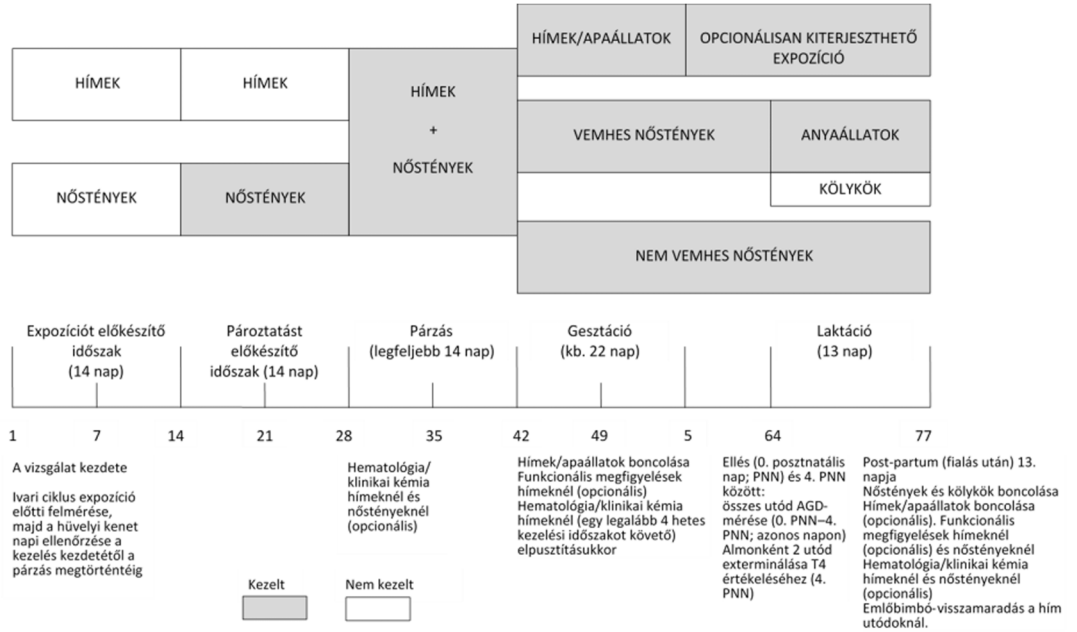
Validáció tudományos folyamat, amelynek célja egy adott vizsgálati módszer működési követelményeinek és korlátjainak jellemzése, valamint megbízhatóságának és egy adott célhoz kapcsolódó relevanciájának igazolása.

▼**M8**

2. függelék

A KÍSÉRLETI ÜTEMTERV ÁBRÁJA, AMELY JELZI A VIZSGÁLAT TELJES 14 NAPOS PÁRZÁSI IDŐSZAKON ALAPULÓ MAXIMÁLIS IDŐTARTAMÁT





▼**M8**

3. függelék

TÁBLÁZATOS ÖSSZEFOGLALÓ JELENTÉS A SZAPORODÁSRA/FEJLŐDÉSRE GYAKOROLT HATÁSOKRÓL

MEGFIGYELÉSEK	ÉRTÉKEK				
Adagolás (egységek).....	0 (kontroll)	...	...	...	...
Kezdő párok (Sz)					
Ivari ciklus (legalább az átlagos időtartam és az irreguláris ciklusok gyakorisága)					
Bizonyítottan párosított nőstények (Sz)					
Vemhességet elért nőstények (Sz)					
Fogantatás napja 1–5. (Sz)					
Fogantatás napja 6–... ([1]) (Sz)					
Vemhesség ≤ 21 nap (Sz)					
Vemhesség = 22 nap (Sz)					
Vemhesség ≥ 23 nap (Sz)					
Élve született utódokkal rendelkező anyaállatok (Sz)					
Post-partum 4. napján élő utódokkal rendelkező anyaállatok (Sz)					
Beágyazódások/anyaállat (átlag)					
Élő utódok/anyaállat az ellésnél (átlag)					
Élő utódok/anyaállat a 4. napon (átlag)					
Ivararány (h/n) az ellésénél (átlag)					
Ivararány (h/n) a 4. napon (átlag)					
Alom egyedsúlya az ellésnél (átlag)					
Alom egyedsúlya a 4. napon (átlag)					
Utódok súlya születéskor (átlag)					
Utódok súlya az AGD-mérés időpontjában (hímek átlaga, nőstények átlaga)					
Utódok AGD-értéke ugyanazon a posztnatális napon, születés utáni 4. napon (hímek átlaga, nőstények átlaga, posztnatális nap feljegyzése)					
Utódok súlya a 4. napon (átlag)					
Utódok súlya a 13. napon (átlag)					

▼M8

MEGFIGYELÉSEK	ÉRTÉKEK				
Hím utódok emlőbimbó-visszamaradása a 13. napon (átlag)					
RENDELLENES UTÓDOK					
Anyaállatok 0-val					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok ≥ 2-vel					
UTÓDOK ELVESZTÉSE					
Prenatális időszak (beágyazódások mínusz élveszületések száma)					
Anyaállatok 0-vel					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok 2-vel					
Anyaállatok ≥ 3-mal					
Posztnatális időszak (élveszületések mínusz a 13. posztnatális napon élők száma)					
Anyaállatok 0-vel					
Anyaállatok 1-gyel					
Anyaállatok 2-vel					
Anyaállatok ≥ 3-mal					

([1]) a párzási időszak utolsó napja

▼M8

B.65. *IN VITRO* BŐRKORRÓZIÓS MEMBRÁNBARRIER-VIZSGÁLATI MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 435. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A bőrkorrózió – az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet) ([1]) meghatározottak szerint – valamely vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, amely a felhámon át az irhára is átterjedő látható szövetelhalást okoz. Ez a vizsgálati módszer, amely egyenértékű az OECD 435. átdolgozott vizsgálati iránymutatásával, egy olyan *in vitro* membránbarrier-vizsgálatot foglal magában, amellyel azonosíthatók a korrozív vegyi anyagok. A vizsgálati módszer egy olyan mesterséges membránt alkalmaz, amely az állatbőrhöz hasonló módon reagál a korrozív vegyi anyagokra in situ.

2. A hagyományos bőrkorróziós vizsgálatoknál a vizsgálati vegyi anyagot élő állatok bőrére viszik fel, majd egy meghatározott idő elteltével felmérik a szövetkárosodás mértékét (2). E vizsgálati módszeren túl elfogadtak néhány más *in vitro* vizsgálati módszert is a korrozív vegyi anyagok azonosítására használt (az OECD 404. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű és e melléklet B.4. fejezetében ismertetett), standardnak számító, nyulakon végzett *in vivo* bőrkorróziós eljárás (2) alternatívájaként (3) (4). Az ENSZ GHS többszintes vizsgálati és értékelési stratégiát határoz meg a bőrkorrózió felméréséhez és osztályozásához, a bőrirritáció/bőrkorrózió vonatkozásában végzett vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről (IATA) szóló OECD-iránymutatás 3. és 4. modulja (1) (5) pedig validált és elfogadott *in vitro* vizsgálati módszerek használatát ajánlja. Az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés (IATA) információforrásokat és adatelemző eszközöket csoportosító több modult ismertet, továbbá i. iránymutatást nyújt arra nézve, hogy miként integrálhatók és használhatók az ismert vizsgálati és nem vizsgálati adatok a vegyi anyagok potenciális bőrirritációs és bőrkorróziós hatásainak felmérésére, és ii. javaslatot tesz egy, a további vizsgálatok szükségessége esetén alkalmazható megközelítésre, amely kiterjed a negatív vizsgálati eredmények esetére is (5). E moduláris megközelítés révén az *in vitro* vizsgálati módszerek pozitív eredményei alapján megállapítható a vegyi anyagok korrozivitása anélkül, hogy állatkísérletekre lenne szükség, ezáltal visszaszorul és finomodik az állatok kísérleti felhasználása, és elkerülhető mindaz a fájdalom és szorongás, amely előfordulhatott volna, ha állatokkal végzik a kísérletet.

3. A kereskedelmi forgalomban Corrositex® (6) (7) (8) néven kapható *in vitro* membránbarrier-modellen végzett validálási vizsgálatok kimutatták, hogy a modell egy 163 anyagból és keverékből álló adatbázis (7) tekintetében összességében 79 %-os (128/163) pontossággal, 85 %-os (76/89) érzékenységgel és 70 %-os (52/74) specificitással jelezi előre a bőrkorróziót. A modellt – elismert hitelessége alapján – validált referenciamódszerként arra ajánlják, hogy egy többszintű vizsgálati stratégia részeként alkalmazzák a vegyi anyagok által esetlegesen okozott bőrkorróziós veszély felmérésére (5)(7). Mielőtt egy *in vitro* bőrkorróziós membránbarrier-modell szabályozási célú alkalmazásra kerülne, a validált referenciamódszerhez (9) való hasonlóságának biztosítása érdekében az előre meghatározott teljesítményszabványok (10) követelményeinek megfelelően meg kell állapítani a javasolt felhasználása tekintetében fennálló megbízhatóságát, relevanciáját (pontosságát) és korlátait. Az adatok OECD-megállapodás szerinti kölcsönös elfogadása

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

▼M8

csak azután garantált, hogy a javasolt új vagy átdolgozott módszert a teljesítményszabványok szerint felülvizsgálták és belefoglalták az OECD megfelelő vizsgálati iránymutatásába. Jelenleg egyetlen *in vitro* módszer tartozik az OECD 435. vizsgálati iránymutatása alá, és ez a vizsgálati módszer a kereskedelmi forgalomban beszerezhető Corrositex® modell.

4. A bőrkorrózió felmérésére szolgáló egyéb vizsgálati módszerek a rekonstruált humán bőr (az OECD 431. vizsgálati iránymutatása) (3) és az izolált patkánybőr (az OECD 430. vizsgálati iránymutatása) (4) használatán alapulnak. Emellett e vizsgálati iránymutatás lehetővé teszi azt, hogy a korrozív vegyi anyagokat alkategóriába sorolják az ENSZ GHS három korrozivitási alkategóriája és az ENSZ korróziós veszélyt jelentő anyagok szállítására vonatkozó három csomagolási csoportja szerint. Az eredetileg 2006-ben elfogadott vizsgálati iránymutatást 2015-ben átdolgozták, hogy figyelembe vegyék az IATA-iránymutatást és frissítsék a jártassági tesztanyagok jegyzékét.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

5. Az alkalmazott fogalmak meghatározása a függelékben található.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

6. Az e vizsgálati módszer keretében leírt vizsgálat lehetővé teszi a korrozív vizsgálati vegyi anyagok azonosítását és ezen anyagok ENSZ GHS/CLP-rendelet szerinti alkategorizálását (1. táblázat). Emellett a vizsgálati módszer alkalmas arra, hogy a szállításukkal összefüggő vizsgálati célokból kifolyólag bizonyos kémiai anyagosztályok, pl. szerves és szervetlen savak, savszármazékok ([1]) és lúgok tekintetében megállapítsák a korrozivitást, illetve annak hiányát (7) (11) (12). Ez a vizsgálati módszer a validált vizsgálati referenciamódszerhez hasonló általános eljárást ír le (7). Ez a vizsgálati módszer ugyan nem biztosít elegendő információt a bőrirritáció felméréséhez, de (az OECD 439. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű) B.46. vizsgálati módszer célja kifejezetten az, hogy a bőrirritációs egészségügyi hatásokat *in vitro* határozza meg (13). Egyetlen bőrexpozíció után a bőrt ért helyi hatások teljes kiértékeléséhez a vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről szóló OECD-iránymutatást kell tanulmányozni (5).

1. táblázat

Az ENSZ GHS szerinti bőrkorróziós kategóriák és alkategóriák ([1])

Korrozív kategória (1. kategória) (alkategóriákat nem használó hatóságoknak)	Alkalmazható korrozív alkategóriák ([1]) (alkategóriákat, pl. a CLP-rendeletet használó hatóságoknak)	Korrozív 3 állat közül legalább 1 esetében	
		Expozíció	Megfigyelés
Korrozív	1A korrozivitási alkategória	≤ 3 perc	≤ 1 óra
	1B korrozivitási alkategória	> 3 perc / ≤ 1 óra	≤ 14 nap
	1C korrozivitási alkategória	> 1 óra / ≤ 4 óra	≤ 14 nap

([1]) A CLP-rendelet az EU-ra vonatkozólag három bőrkorróziós alkategóriát alkalmaz: 1A, 1B és 1C.

7. A validált referenciamódszer (7) korlátja, hogy az előzetes kompatibilitási vizsgálat (lásd a 13. pontot) eredményei alapján számos nem korrozív vegyi anyagra és néhány korrozív vegyi anyagra nem alkalmazható a vizsgálat. A 4,5 és 8,5 közötti pH-értékkel rendelkező vízbázisú vegyi anyagok gyakran

([1]) A „savszármazék” egy általános megnevezés, amely tág értelemben véve a valamely savból közvetlenül, vagy módosítás vagy részleges szubsztitúció útján előállított vegyi anyagot jelenti. Ebbe az osztályba tartoznak az anhidridek, a halosavak, a sók és más vegyi anyag típusok.

▼M8

nem alkalmasak a vizsgálatra; ugyanakkor az e pH-tartományban vizsgált vegyi anyagok 85 %-a nem bizonyult korrozívnak az állatkísérletek során (7). Az *in vitro* membránbarrier módszer alkalmazható (vízben oldható és oldhatatlan) szilárd anyagok, (vizes és nem vízbázisú) folyadékok, valamint emulziók vizsgálatára. Azonban azokat a vizsgálati vegyi anyagokat, amelyek a kompatibilitási vizsgálat során nem idéznek elő kimutatható változást (vagyis színváltozást a validált vizsgálati referenciamódszer vegyi anyagok észlelésére szolgáló rendszerében (Chemical Detection System, CDS)), a membránbarrier módszertől eltérő vizsgálati módszerekkel kell vizsgálni.

A VIZSGÁLAT ELVE

8. A vizsgálati rendszer két összetevőből áll: egy szintetikus makromolekuláris biobarrierből és egy kémiai érzékelő rendszerből (CDS); ez a vizsgálati módszer a kémiai érzékelő rendszeren keresztül – feltételezhetően az élő bőrre ható korróziós mechanizmussal/mechanizmusokkal megegyező módon – detektálja a membránbarrier korrozív vizsgálati vegyi anyagok okozta károsodását, miután a vizsgálati vegyi anyagot a szintetikus makromolekuláris membránbarrier felszínén alkalmazták (7).

9. A membránbarrieren való áthatolás (vagy áttörés) számos eljárással vagy a kémiai érzékelő rendszerrel mérhető, többek között azáltal, hogy a pH-indikátor festék színe vagy az indikátoroldat bizonyos más tulajdonságai megváltoznak a barrier alatt.

10. Meg kell állapítani a membránbarrier hitelességét, vagyis azt, hogy tervezett használata szempontjából releváns és megbízható. Ez magában foglalja annak biztosítását, hogy a különböző preparátumok barriertulajdonságai állandók, például képesek barrierként működni a nem korrozív vegyi anyagokkal szemben, valamint képesek a vegyi anyagok korrozív tulajdonságainak osztályozására az ENSZ GHS különböző korrozivitási alkategóriái szerint (1). A besorolás alapja az az idő, amely alatt egy adott vegyi anyag a membránbarrieren áthatolva az indikátoroldatba jut.

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

11. Az e vizsgálati módszer alá tartozó *in vitro* membránbarrier módszer rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak a 2. táblázatban felsorolt tizenkét jártassági tesztanyag megfelelő besorolásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Ha a jegyzékben szereplő valamely anyag nem áll rendelkezésre, illetve ha indokolható, megfelelő *in vivo* és *in vitro* referenciaadatokkal rendelkező más – például a referencia-vegyianyagok jegyzékében feltüntetett (10) – anyag is használható, amennyiben a kiválasztási kritériumok megegyeznek az 1. táblázatban foglaltakkal.

2. táblázat

Jártassági tesztanyagok ([1])

Anyag ([2])	CAS-szám	Kémiai osztály	*In vivo* ENSZ GHS alkategória ([3])	*In vitro* ENSZ GHS alkategória ([3])
Bór-trifluorid-dihidrát	13319-75-0	Szervetlen savak	1A	1A
Salétromsav	7697-37-2	Szervetlen savak	1A	1A
Foszfor-pentaklorid	10026-13-8	Szervetlen savak prekurzorai	1A	1A
Valeril-klorid	638-29-9	Savkloridok	1B	1B
Nátrium-hidroxid	1310-73-2	Szervetlen lúgok	1B	1B

▼M8

Anyag ([2])	CAS-szám	Kémiai osztály	*In vivo* ENSZ GHS alkategória ([3])	*In vitro* ENSZ GHS alkategória ([3])
1-(2-aminoetil) piperazin	140-31-8	Alifás aminok	1B	1B
Benzolszulfonil-klorid	98-09-9	Savkloridok	1C	1C
N,N-dimetil-benzilamin	103-83-3	Anilinok	1C	1C
Tetraetilén-pentamin	112-57-2	Alifás aminok	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Fenolok	NK	NK
Nonil-akrilát	2664-55-3	Akrilátok/metakrilátok	NK	NK
Nátrium-bikarbonát	144-55-8	Szervetlen sók	NK	NK

([1]) A fentiekben felsorolt tizenkét anyag közül három-három tartozik a korrozív anyagok ENSZ GHS szerinti egyes alkategóriáiba és három nem korrozív anyag, kereskedelmi forgalomban könnyen beszerezhetők, az ENSZ GHS szerinti alkategóriák pedig minőségi *in vivo* vizsgálatok eredményei alapján kerültek meghatározásra. Ezek az anyagok egy 40 referenciaanyagból álló jegyzékből származnak, részét képezik a validált vizsgálati referenciamódszerhez strukturálisan és funkcionálisan hasonló vizsgálati módszerek pontosságának és megbízhatóságának igazolására kijelölt vegyi anyagok minimális jegyzékének, és az eredetileg a vizsgálati referenciamódszer (Corrositex®) (7) (10) (14) validálásához használt 163 referencia-vegyianyagból kerültek kiválasztásra. A kiválasztási eljárás során a lehetőségekhez mérten olyan anyagokat igyekeztek kiválasztani, amelyek: a validált vizsgálati referenciamódszer által mérhető vagy megbecsülhető korrozivitási válaszreakciók tartománya tekintetében reprezentatívak (pl. nincs korrozív hatásuk; az ENSZ I., II. és III. csomagolási csoportja szerinti korróziós hatást váltanak ki); a validálási eljárás során használt kémiai osztályok tekintetében reprezentatívak; jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek; megismételhető eredményeket hoznak a validált vizsgálati referenciamódszer alkalmazásakor; egyértelmű eredményeket hoznak az *in vivo* referenciavizsgálatban; kereskedelmi forgalomban kaphatók; és nem kapcsolódnak hozzájuk vállalhatatlanul magas ártalmatlanítási költségek (14).

([2]) Az anyagokat tisztán vagy legalább 90 %-os tisztasággal vizsgálták.

([3]) Az ENSZ GHS szerinti 1A, 1B és 1C alkategóriának az ENSZ I., II. és III. csomagolási csoportja felel meg. NK: Nem korrozív.

ELJÁRÁS

12. Az alábbi pontok egy, a korrózió felmérésére szolgáló mesterséges membránbarrier vizsgálati módszer (7) (15) összetevőit és eljárásait ismertetik, amelynek alapja a jelenlegi validált referenciamódszer, vagyis a kereskedelmi forgalomban kapható Corrositex®. A membránbarrier, valamint a kompatibilitást meghatározó/indikátor- és kategorizáló oldatok összeállíthatók, elkészíthetők vagy kereskedelmi forgalomban beszerezhetők, mint a Corrositex® validált referenciamódszer. A validált vizsgálati referenciamódszerhez rendelkezésre áll a vizsgálati módszer mintaprotokollja (7). A vizsgálatot szobahőmérsékleten (17–25 °C) kell elvégezni, az összetevőknek pedig meg kell felelniük az alábbi feltételeknek.

A vizsgálati vegyi anyag kompatibilitási tesztje

13. A membránbarrier-vizsgálat előtt egy kompatibilitási vizsgálat során meg kell határozni, hogy a kémiai érzékelő rendszer képes-e detektálni a vizsgálati vegyi anyagot. Amennyiben a kémiai érzékelő rendszer nem mutatja ki a vizsgálati vegyi anyagot, a membránbarrieres vizsgálati módszer nem alkalmas az adott vizsgálati vegyi anyag potenciális korróziós hatásának értékelésére, ezért mást vizsgálati módszert kell alkalmazni. A kompatibilitási vizsgálat során olyan kémiai érzékelő rendszert és expozíciós körülményeket kell alkalmazni, amelyek megegyeznek a későbbi membránbarrier-vizsgálat expozíciójával.

A vizsgálati vegyi anyag időskálán alapuló kategorizálási vizsgálata

14. Amennyiben az a vizsgálati módszer szempontjából releváns, a kompatibilitási vizsgálat során alkalmasnak nyilvánított vizsgálati vegyi anyagokon el kell végezni egy időskálán alapuló kategorizálási vizsgálatot, vagyis egy olyan szűrővizsgálatot, amely megkülönbözteti a gyenge és az erős savakat

▼M8

és a bázisokat. A validált vizsgálati referenciamódszerben például egy időskálán alapuló kategorizálási vizsgálat során határozzák meg, hogy a két időskála közül melyiket használják, annak alapján, hogy kimutattak-e jelentős sav- vagy lúgtartalékot. A bőrkorrozivitás és az ENSZ GHS szerinti korrozivitási alkategória meghatározásához az adott vizsgálati vegyi anyag sav- vagy lúgtartaléka szerint két különböző, áthatolási időn alapuló időskála áll rendelkezésre.

A MEMBRÁNBARRIERES VIZSGÁLATI MÓDSZER ÖSSZETEVŐI

Membránbarrier

15. A membránbarrier két összetevőből áll: egy fehérjetartalmú makromolekuláris vízbázisú gélből és egy áteresztő membránból. A fehérjetartalmú gél nem ereszti át a folyadékokat és a szilárd anyagokat, ugyanakkor korrózió útján áteresztővé tehető. A teljesen összeállított membránbarriert előre meghatározott körülmények között kell tárolni, amelyek bizonyítottan kizárják a gél minőségromlását, pl. kiszáradását, a mikrobák elszaporodását, elmozdulását, megrepedezését, ami csökkentené teljesítményét. Meg kell határozni az elfogadható tárolási időt, és annak lejártát követően nem szabad felhasználni a membránbarrier-preparátumokat.

16. Az áteresztő membrán fizikai alátámasztást biztosít a fehérjetartalmú gélnek a gélesedési folyamat és a vizsgálati vegyi anyaggal való kezelés során. A membránnak meg kell akadályoznia a gél beesését és elcsúszását, továbbá átjárhatónak kell lennie minden vizsgálati vegyi anyag számára.

17. A fehérjetartalmú gél, amely gélmátrixot képező fehérjékből, például keratinból, kollagénből vagy fehérjekeverékekből tevődik össze, a vizsgálati vegyi anyag célpreparátuma. A fehérjetartalmú anyagot felviszik a membrán felületére, és megvárják, amíg gélesedik, majd ezt követően a membránbarriert az indikátoroldat fölé helyezik. A fehérjetartalmú gél teljes felületének egyforma vastagságúnak és sűrűségűnek kell lennie, továbbá nem tartalmazhat légbuborékokat és egyéb olyan hibákat, amelyek károsíthatják funkciójának épségét.

A kémiai érzékelő rendszer

18. Az indikátoroldatnak, amely megegyezik a kompatibilitási vizsgálat során alkalmazott oldattal, reagálnia kell a vizsgálati vegyi anyag jelenlétére. Olyan pH-indikátor festéket vagy festékkombinációt (pl. krezolvörös és metilnarancs) kell használni, amely színváltozással reagál a vizsgálati vegyi anyag jelenlétére. A mérési rendszer lehet vizuális vagy elektronikus.

19. A vizsgálati vegyi anyagok barriermembránon keresztüli áthaladásának észlelésére kifejlesztett detektorrendszerek alkalmasságát és megbízhatóságát értékelni kell, hogy igazolni lehessen az általuk észlelhető vegyi anyagok körét és az észlelés mennyiségi korlátait.

A VIZSGÁLAT KIÉRTÉKELÉSE

A vizsgálati módszer alkotóelemeinek összeállítása

20. A membránbarriert az indikátoroldatot tartalmazó ampullába (vagy csőbe) helyezik oly módon, hogy a membrán teljes felületén érintkezzen az indikátoroldattal és ne alakuljanak ki légbuborékok. Ügyelni kell arra, hogy a barrier épsége fennmaradjon.

▼M8

A vizsgálati vegyi anyag alkalmazása

21. A vizsgálati vegyi anyagot megfelelő, azaz például folyadék esetében 500 µl, finomra porított szilárd anyag esetében 500 mg (7) mennyiségben óvatosan fel kell vinni a membránbarrier felső felszínére, majd egyenletesen szét kell oszlatni a felületen. Minden vizsgálati vegyi anyag és az annak megfelelő kontrollok esetében megfelelő számú, például négy (7) replikátumot kell készíteni (lásd a 23–25. pontot). A vizsgálati vegyi anyag membránbarrierre történő felvitelének időpontját rögzíteni kell. Annak érdekében, hogy a rövid hatóidejű korróziót is pontosan lehessen rögzíteni, a vizsgálati vegyi anyagot szakaszosan kell a replikátum csövekbe felvinni.

A membránbarrieren való áthatolás mérése

22. Minden csövet gondosan megfigyelnek, és feljegyzik az indikátoroldat első elváltozásának, vagyis a barrieren történő áthatolásnak az időpontját, majd meghatározzák a felvitel és a membránbarrieren való áthatolás között eltelt időt.

Kontrollok

23. Azokban a vizsgálatokban, amelyekben a vizsgálati vegyi anyagot vivőanyaggal vagy oldószerrel együtt alkalmazzák, a vivőanyagnak vagy az oldószernek kompatibilisnek kell lennie a membránbarrier rendszerrel, azaz nem lehet hatással sem a membránbarrier rendszer épségére, sem a vizsgálati vegyi anyag korrozivitására. Adott esetben a vizsgálati vegyi anyaggal párhuzamosan kontrollvizsgálatot kell végezni az oldószerrel (vagy a vivőanyaggal) annak igazolására, hogy az kompatibilis a membránbarrier rendszerrel.

24. A vizsgálati vegyi anyaggal egyidejűleg egy közepesen korrozív anyaggal, például 110 ± 15 mg nátrium-hidroxiddal (amely az ENSZ GHS szerinti 1B alkategóriába tartozik) (7) pozitív (korrozív) kontrollt kell végezni a vizsgálati rendszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának értékelésre. A korrozív vizsgálati vegyi anyagok relatív korróziós potenciáljának felméréséhez hasznosnak bizonyulhat egy, a vizsgálati vegyi anyaggal azonos kémiai osztályba tartozó anyaggal végzett második pozitív kontroll. A pozitív kontrollanyagként közepesen korrozív (pl. az ENSZ GHS szerinti 1B alkategóriába tartozó) anyagot kell választani, hogy észlelni lehessen, ha az áthatolási idő elfogadhatatlanul hosszú vagy rövid a meghatározott referenciaértékhez képest, ami azt jelzi, hogy a vizsgálati rendszer nem működik megfelelően. E tekintetben a rendkívül korrozív (az ENSZ GHS szerinti 1A alkategóriába tartozó) vagy a nem korrozív hatású vegyi anyagok használhatósága korlátozott. Ugyanakkor az ENSZ GHS szerinti 1B alkategóriába tartozó korrozív vegyi anyagok lehetővé teszik a túl gyors vagy túl lassú áthatolási idő észlelését. Az enyhén korrozív (az ENSZ GHS szerinti 1C alkategóriába tartozó) anyagok használhatók pozitív kontrollként annak mérésére, hogy a vizsgálati módszer képes-e megbízhatóan különbséget tenni az enyhén korrozív és a nem korrozív hatású vegyi anyagok között. Az alkalmazott megközelítéstől függetlenül a használt pozitív kontrollanyag(ok) áthatolási idejének dokumentált tartománya alapján meg kell határozni a pozitív kontroll válaszreakciójának elfogadható tartományát, úgy mint az átlagérték ± 2–3 standard deviációt. Minden vizsgálat során meg kell állapítani a pozitív kontrollanyag pontos áthatolási idejét, hogy észlelni lehessen az elfogadható tartománytól való eltéréseket.

25. Negatív kontrollként egy negatív (nem korrozív) kontrollanyagot – például 10 % citromsav, 6 % propionsav (7) – is vizsgálni kell a vizsgálati vegyi anyaggal egyidejűleg, amely egy másik minőség-ellenőrzési mérésként igazolja a membránbarrier épségét.

▼M8

A vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

26. Az egyes ENSZ GHS szerinti korrozivitási alkategóriákra meghatározott időparaméterek alapján a vizsgálati vegyi anyag membránbarrierre történő felvitele és a barrieren való áthatolása között eltelt (percben mért) időt használják a vizsgálati vegyi anyag korrozivitásának előrejelzésére. Ahhoz, hogy egy vizsgálatot elfogadhatónak minősítsenek, a párhuzamos pozitív kontrollnak a várt áthatolási reakcióidőt kell biztosítania (ami például a nátrium-hidroxid pozitív kontrollként való alkalmazása esetén 8–16 perces áthatolási időt jelent), a párhuzamos negatív kontrollanyag nem lehet korrozív, és – amennyiben sor került rá – a párhuzamos oldószeres kontroll nem lehet korrozív és nem módosíthatja a vizsgálati vegyi anyag korróziós potenciálját. Az e vizsgálati módszer alá tartozó módszer rutinszerű alkalmazását megelőzően a laboratóriumoknak a 2. táblázatban javasolt tizenkét anyag felhasználásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Az e vizsgálati módszer keretében kidolgozott, a validált referenciamódszerhez (14) strukturálisan és funkcionálisan hasonló, úgynevezett „me-too” vizsgálati módszerek szabályozási célú alkalmazása előtt az előre meghatározott teljesítményszabványok használatával igazolni kell az új módszer megbízhatóságát és pontosságát (10).

Az eredmények értelmezése és a vizsgálati vegyi anyagok korrozivitási osztályba sorolása

27. A vizsgálati vegyi anyag membránbarrierre történő felvitele és a barrieren való áthatolása között eltelt (percben mért) időt használják a vizsgálati vegyi anyag – ENSZ GHS szerinti korrozivitási alkategóriák (1) és adott esetben az ENSZ csomagolási csoportjai (16) szerinti – osztályozására. Az egyes javasolt vizsgálati módszerekre nézve meghatározzák a három korrozivitási alkategóriát elválasztó időértékeket. A kategóriákat elválasztó időértékekre vonatkozó végső döntés során törekedni kell arra, hogy minimalizálják a korrozív veszély alulkategorizálását (vagyis az álnegatív eredményeket). E vizsgálati iránymutatás keretén belül a Corrositex® 3. táblázatban feltüntetett időértékeit kell figyelembe venni, mivel jelenleg ez az egyetlen vizsgálati módszer tartozik a vizsgálati iránymutatáshoz (7).

3. táblázat

Corrositex® előrejelzési modell

Átlagos áthatolási idő (percben)		ENSZ GHS előrejelzés ([3])
1. kategóriába sorolt vizsgálati vegyi anyagok ([1]) (a módszer kategorizálási vizsgálata alapján)	2. kategóriába sorolt vizsgálati vegyi anyagok ([2]) (a módszer kategorizálási vizsgálata alapján)	
0–3 perc	0–3 perc	Korrozív opcionális 1A alkategória
> 3–60 perc	> 3–30 perc	Korrozív opcionális 1B alkategória
> 60–240 perc	> 30–60 perc	Korrozív opcionális 1C alkategória
> 240 perc	> 60 perc	Nem korrozív

([1]) Magas sav-/lúgtartalékkal rendelkező vizsgálati vegyi anyagok (6)
([2]) Alacsony sav-/lúgtartalékkal rendelkező vizsgálati vegyi anyagok (6)
([3]) Az ENSZ GHS szerinti 1A, 1B és 1C alkategóriának az ENSZ I., II. és III. csomagolási csoportja felel meg

▼**M8**

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

28. Minden kísérlet esetében táblázatba kell foglalni a vizsgálati vegyi anyag és a pozitív kontrollanyag(ok) felvitele és a barrieren való áthatolás között eltelt (percben mért) időt az egyes ismétlések adataként, az átlagérték ± a szórás megadásával.

Vizsgálati jelentés

29. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag és kontrollként szolgáló anyagok:

— Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;

— több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek: amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai jellemzik;

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— eredet, gyártási szám, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag/kontrollanyag kezelése a vizsgálatot megelőzően, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, felhasználási határideje vagy ismételt elemzésének napja, ha ismert;

— tárolási feltételek.

Vivőanyag:

— név, (adott esetben) koncentráció, alkalmazott térfogat;

— a vivőanyag megválasztásának indokolása.

Az alkalmazott in vitro membránbarrier-modell és protokoll, ideértve az igazolt pontosságot és megbízhatóságot

Vizsgálati körülmények:

— az alkalmazott műszer és az elkészítési eljárások leírása;

— az alkalmazott *in vitro* membránbarrier eredete és összetétele;

— az indikátoroldat összetétele és jellemzői;

— a kimutatás módszere;

— a vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok mennyisége;

— replikátumok száma;

— az időskálán alapuló kategorizálási vizsgálat leírása és indokolása;

▼**M8**

— az alkalmazás módja;

— megfigyelési időszakok;

— az alkalmazott értékelési és osztályozási kritériumok leírása;

— a vizsgálati módszer végrehajtásában való jártasság bizonyítása a módszer rutinszerű használata előtt, a jártassági tesztanyagok vizsgálata révén.

Eredmények:

— az egyes replikátumok egyedi vizsgálatából és kontrollmintáiból nyert egyedi nyers adatok táblázatba foglalása;

— a megfigyelt egyéb hatások leírása;

— az alkalmazott előrejelzési modellel/döntési kritériumokkal összhangban kialakított osztályozás.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Elérhető a következő címen:http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) E melléklet B.4., Akut bőrirritáció/bőrkorrózió fejezete.

(3) E melléklet B.40bis., *In vitro* bőrkorrózió: rekonstruált emberi felhám-modellen végzett vizsgálati módszer című fejezete.

(4) E melléklet B.40., *In vitro* bőrkorrózió: transzkután elektromos rezisztencia (TER) vizsgálat című fejezete.

(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). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: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) E melléklet B.46., *In vitro* bőrirritáció: Rekonstruált emberi felhámmodellen végzett vizsgálati módszer című fejezete. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Elérhető a következő címen:http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Elérhető a következő címen:http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Elérhető a következő címen:http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

▼M8

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezés” megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (9).

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Kémiai érzékelő rendszer: vizuális vagy elektronikus mérési rendszer indikátoroldattal, amely reagál a vizsgálati vegyi anyagok jelenlétére, például azáltal, hogy módosul a vizsgálati vegyi anyag jelenlétére színváltozással reagáló pH-indikátor festék vagy festékkombináció, illetve más típusú kémiai vagy elektrokémiai reakciók által.

Egyezés: a kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. A kifejezést esetenként használják a pontosság megfelelőjeként, és úgy határozzák meg, mint a helyesen pozitívként vagy negatívként besorolt összes vizsgálati vegyi anyag aránya. Az egyezés nagy mértékben függ a vizsgálat tárgyát képező vizsgálati vegyi anyag típusaiban előforduló pozitív eredmények gyakoriságától (9).

GHS (a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszere): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

IATA: integrált vizsgálati és értékelési megközelítés.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

NK: nem korrozív.

Teljesítményszabványok: hitelesített referenciamódszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és iii. a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, azokhoz hasonló megbízhatósági és pontossági szint, amelyet a javasolt vizsgálati módszernek teljesítenie kell a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke szerinti értékelése során (9).

▼**M8**

Relevancia: a vizsgálati módszer és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálati módszer mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (9).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (9).

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálati módszer helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (9).

***In vivo** bőrkorrózió*: a vizsgálati vegyi anyag alkalmazását követően négy órán belül megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, azaz a felhámon át az irhára is átterjedő látható szövetelhalás. A korróziós tünetek jellemzően fekély, vérzés, véres hegesedés és – 14 napos megfigyelés végén – a bőr kifehéredése miatt elszíneződés, teljes szőrhullásos területek és hegek. A kérdéses lézió értékeléséhez figyelembe kell venni a kórszövettant.

Specificitás: a vizsgálati módszerrel helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (9).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, valamint komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

▼M8

B.66. STABILAN TRANSZFEKTÁLT TRANSZAKTIVÁCIÓS *IN VITRO* VIZSGÁLATOK ÖSZTROGÉNRECEPTOROK AGONISTÁINAK ÉS ANTAGONISTÁINAK ÉSZLELÉSÉRE

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

Az OECD teljesítményalapú vizsgálati iránymutatása

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 455. vizsgálati iránymutatásában (2016) leírt módszerrel. A 455. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás (PBTG) az ösztrogénreceptorok agonistáinak és antagonistáinak észlelésére szolgáló stabilan transzfektált transzaktivációs *in vitro* vizsgálatok (ER TA vizsgálatok) módszertanát ismerteti. Az iránymutatás több mechanikusan és funkcionálisan hasonló vizsgálati módszert tartalmaz az ösztrogénreceptor (vagyis az ERα és/vagy ERβ ösztrogénreceptor) agonistáinak és antagonistáinak azonosítására, és a veszély értékelésére szolgáló új és átdolgozott vizsgálati módszerek validálásáról és nemzetközi elfogadásáról szóló OECD-irányelvben (1) megfogalmazott validálási elvekkel összhangban megkönnyíti az új – hasonló vagy módosított – vizsgálati módszerek kidolgozását. A teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás alapjául szolgáló, teljes körűen validált (a 2. és a 3. függelékben ismertetett) vizsgálati referenciamódszerek a következők:

— a stabilan transzfektált transzaktivációs (STTA) vizsgálat (2), amely (h) ERα-HeLa-9903 sejtvonalat alkalmaz; valamint

— a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat (3), amely VM7Luc4E2 sejtvonalat ([1]) alkalmaz, ami elsősorban a humán ösztrogénreceptor α-t, kisebb mértékben a humán ösztrogénreceptor β-t fejezi ki (4) (5).

Az ugyanezt a veszélyességi végpontot célzó hasonló vizsgálatok kidolgozásához és validálásához rendelkezésre állnak és alkalmazandók teljesítményszabványok (6) (7). A teljesítményszabványok lehetővé teszik a 455. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás időben történő módosítását, hogy az új, hasonló vizsgálatokat be lehessen építeni az átdolgozott iránymutatásba; hasonló vizsgálatok azonban csak azután foglalhatók bele az iránymutatásba, hogy az OECD felülvizsgálta és jóváhagyta a teljesítményszabványok alkalmazását. A 455. vizsgálati iránymutatás alá tartozó vizsgálatok egységesen felhasználhatók az OECD-tagállamok ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatok eredményeire vonatkozó követelményeinek kialakításához, ugyanakkor biztosítják az adatok kölcsönös elfogadásának előnyeit.

A vizsgálati módszerhez tartozó vizsgálatok háttere és elvei

2. Az OECD 1998-ban kiemelt fontosságú tevékenységet indított az endokrin rendszert esetlegesen károsító vegyi anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálata, valamint új

([1]) 2016 júniusa előtt ezt a sejtvonalat BG1Luc sejtvonalnak nevezték. A BG-1 sejteket eredetileg Greisinger és munkatársai (1998) írták le (35), később pedig a National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) kutatói karakterizálták (36). Nemrégiben rájöttek arra, hogy a kutatók a BG-1 sejtek két különböző variánsát, a BG-1 Fr-t és a BG-1 NIEHS-t használják. Li és munkatársai (2014) (37) a két BG-1 sejtvonalvariáns részletes elemzése, többek között DNS-vizsgálatuk elvégzése révén kimutatták, hogy a BG-1 Fr egyedi sejtvonal, és hogy a BG-1 NIEHS, vagyis a vizsgálat kidolgozásához eredetileg használt sejtvonal nem a BG1 humán petefészekrák sejtvonala, hanem az MCF7 humán mellráksejtvonal variánsa. A vizsgálatban alkalmazott sejtvonal, eredeti elnevezésén a BG1Luc4E2 (38), immár VM7Luc4E2 néven szerepel („V” = variáns; „M7” = MCF7 sejtek). Hasonlóképpen a vizsgálat jelenlegi elnevezése az VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktiváció. Bár ez módosítja a vizsgálat alapjául szolgáló sejtvonal eredetét, nem befolyásolja sem a közzétett validálási tanulmányokat, sem a vizsgálat hasznosságát és alkalmazhatóságát az ösztrogén/antiösztrogén hatású vegyi anyagok szűrésére.

▼M8

vizsgálati iránymutatások kidolgozása érdekében. Az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére szolgáló fogalmi keretét 2012-ben átdolgozták. Az elvi keretrendszer eredeti és átdolgozott változatát mellékletként csatolták az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok értékelésére vonatkozó szabványosított vizsgálati iránymutatásokról szóló OECD-iránymutatáshoz (8). Az elvi keretrendszer öt szintet határoz meg, amelyek mindegyike a biológiai komplexitás egy különálló szintjének felel meg. Az e vizsgálati módszer keretében ismertetett ösztrogénreceptor (ER) transzaktivációs (TA) vizsgálatok a 2. szinten helyezkednek el, amely magában foglalja „*a kiválasztott endokrin mechanizmus(ok)ról/útvonal(ak)ról adatokat szolgáltató in vitro vizsgálatokat*”. Ez a vizsgálati módszer *in vitro* transzaktivációs (TA) vizsgálatokra alkalmas, amelyek célja az ösztrogénreceptor (ER) agonistáinak és antagonistáinak azonosítása.

3. Az ösztrogének ösztrogénreceptorokkal való kölcsönhatása befolyásolhatja az ösztrogén kontrollálta gének átírását (transzkripcióját), ami sejtes folyamatok indukciójához vagy gátlásához vezethet, beleértve azokat, amelyek szükségesek a sejtosztódáshoz, a normál magzati fejlődéshez és a szaporodási funkciókhoz (9) (10) (11). A normál ösztrogénrendszerek zavara károsan befolyásolhatja a normál egyedfejlődést (ontogenezist), a reprodukciós egészséget és a reproduktív rendszer integritását.

4. Az *in vitro* transzaktivációs vizsgálatokban a receptor és ligandumja közötti direkt vagy indirekt kölcsönhatások egy riportergén bekapcsolását (transzkripcióját) szabályozzák. Az ilyen vizsgálatokat széles körben használják specifikus sejtmagi receptorok, például ösztrogénreceptorok által szabályozott génkifejeződés értékelésére (12) (13) (14) (15) (16). Javasolt felhasználási területük az ösztrogénreceptorok által szabályozott ösztrogénhatású transzaktiváció észlelése (17) (18) (19). A sejtmagi ösztrogénreceptoroknak legalább két fő altípusa létezik, az α és a β, amelyeket különböző gének kódolnak. A megfelelő fehérjéknek eltérő biológiai funkciói vannak, eltérő a szöveti jelenlétük és ligandumkötő affinitásuk (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). A sejtmagi ösztrogénreceptor α a klasszikus ösztrogénválaszt közvetíti (27) (28) (29) (30), ezért az ösztrogénreceptorok aktiválásának és gátlásának mérésére kifejlesztett modellek többsége az ösztrogénreceptor α-ra specifikus. A vizsgálatokat arra használják, hogy azonosítsanak olyan vegyi anyagokat, amelyek aktiválják (vagy gátolják) az ösztrogénreceptorokat a ligandumkötésben, a kötés révén létrejött receptor-ligandum komplex specifikusan DNS válaszelemekhez kötődik és transzaktivál egy riportergént, megnövelve ezáltal a markerfehérje celluláris kifejeződését. E vizsgálatokban különféle riportergének alkalmazhatók. A luciferáz alapú rendszerekben a luciferáz enzim a luciferin szubsztrátot átalakítja, miközben bioluminescens fény keletkezik, amely luminométerrel számszerűen mérhető. Gyakori riporterre példák lehetnek még a fluoreszcens fehérjék génjei és a *lacZ* gén, ez utóbbi a β-galaktozidázt kódolja, egy olyan enzimet, amely képes a színtelen X-gal szubsztrátot (5-bromo-4-kloro-indolil-galaktopiranozid) kék termékké alakítani, amelynek mennyisége spektrofotométerrel mérhető. Ezek a riporterek kereskedelmi forgalomban kapható vizsgálati készletekkel gyorsan és költséghatékonyan értékelhetők.

5. a stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc transzaktivációs vizsgálatok validálási tanulmányai igazolták, hogy e vizsgálatok tervezett felhasználásuk tekintetében relevánsak és megbízhatóak (3) (4) (5) (30). A lumineszcencián alapuló, mellrák sejtvonalat alkalmazó ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatok teljesítményszabványait az ICCVAM belefoglalta a „LUMI-CELL® ösztrogénreceptor (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: a vegyi anyagok humán ösztrogénreceptorokra kifejtett agonista és antagonista aktivitásának azonosítására szolgáló *in vitro* vizsgálat” című (3), vizsgálati módszert értékelő jelentésébe. Ezeket a teljesítményszabványokat módosították, hogy alkalmazhatók legyenek mind a stabilan transzfektált transzaktivációs, mind a VM7Luc transzaktivációs vizsgálatra (2).

6. A vizsgálati módszerben használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

▼M8

A transzaktivációs vizsgálatok alkalmazási területe és korlátai

7. E vizsgálatokat szűrési és rangsorolási célra ajánlják, ugyanakkor a mechanizmusra vonatkozólag is képesek adatokat szolgáltatni, amelyek felhasználhatók egy bizonyítékok súlyozásán (WoE) alapuló megközelítésben. A vizsgálatok tárgya egy vegyi anyag ösztrogénreceptorokhoz való kötődése által előidézett transzaktiváció *in vitro* rendszerben. Ezért az eredményekből nem lehet közvetlenül következtetni az intakt *in vivo* endokrin rendszerben megvalósuló összetett jelátvitelre és szabályozásra.

8. Habár az ösztrogénreceptorok által kiváltott transzaktivációt az endokrin zavarok (ED) hátterében álló egyik fő mechanizmusként tartják számon, más mechanizmusok is okozhatnak endokrin zavarokat, többek között i. az endokrin rendszeren belüli más receptorokkal és enzimrendszerekkel való interakciók, ii. hormonszintézis, iii. a hormonok metabolikus aktiválása és/vagy inaktiválása, iv. hormonok elszállítása a célszövetekhez és v. hormonok kiürülése a szervezetből. Ezekkel a hatásmechanizmusokkal a tárgyalt vizsgálati módszerhez kapcsolódó vizsgálatok egyike sem foglalkozik.

9. E vizsgálati módszer célja, hogy felmérje a vegyi anyagok ösztrogénreceptor-dependens transzkripció aktiválására (vagyis agonistaként való viselkedésre) és gátlására (vagyis antagonistaként való viselkedésre) való képességét. Egyes vegyi anyagok a sejttípustól függően agonistaként és antagonistaként is viselkedhetnek, ezek az úgynevezett szelektív ösztrogénreceptor modulátorok (SERM). Az e vizsgálatokban negatívnak minősített vegyi anyagok tovább vizsgálhatók egy ösztrogénreceptorhoz kötődési tesztben, mielőtt megállapításra kerülne, hogy nem kötődnek a receptorhoz. Tekintettel az *in vitro* sejtrendszerek korlátozott metabolikus képességére, a vizsgálatok valószínűleg csak a kiindulási molekula hatásáról szolgáltatnak információt. Mivel a validálás során csak egykomponensű anyagokat használtak, a vizsgálat keverékekre való alkalmazhatósága nem vetődött fel. Mindazonáltal a vizsgálati módszer elvileg alkalmazható több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek vizsgálatára. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, több összetevőből álló anyagokon, UVCB-ken és keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

10. Az 1. táblázat tájékoztatási céllal ismerteti az e vizsgálati módszer által leírt mindkét teljes körűen validált vizsgálati referenciamódszerben tesztelt 34 anyagra vonatkozó agonista vizsgálati eredményeket. A szóban forgó anyagok közül 26-ot egyértelmű ösztrogénreceptor agonistaként határoztak meg, a többi 8-at negatívnak minősítették a közzétett jelentések, többek között az *in vitro* ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálatok és/vagy az uterotrofikus vizsgálat alapján (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). A 2. táblázat pedig ismerteti az e vizsgálati módszer által leírt mindkét teljes körűen validált vizsgálati referenciamódszerben vizsgált 15 anyagra vonatkozó antagonista vizsgálati eredményeket. Ezen anyagok közül 4-et egyértelmű/feltételezett ösztrogénreceptor antagonistaként határoztak meg, míg 10-et negatívnak minősítettek a közzétett jelentések, többek között az *in vitro* ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálatok alapján (2) (3) (18) (31). Az 1. és 2. táblázatban összefoglalt adatok vonatkozásában 100 %-os egyezés mutatható ki a két vizsgálati referenciamódszer között valamennyi anyag besorolása tekintetében (az antagonista vizsgálatban szereplő mifepriszton kivételével), és minden anyagot helyesen osztályoztak ösztrogénreceptor agonistaként, ösztrogénreceptor antagonistaként vagy negatívként. E vegyianyag-csoportról, valamint a validálási tanulmányok során a stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatban tesztelt egyéb vegyi anyagokról az ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat teljesítményszabványai nyújtanak bővebb tájékoztatást (6) (7), 2. függelék (1., 2., és 3. táblázat).

▼M8

1. táblázat

A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat eredményeinek áttekintése azon anyagok vonatkozásában, amelyeket mindkét agonista vizsgálatban teszteltek, és ösztrogénreceptor agonistaként (POZ) vagy negatívként (NEG) azonosítottak

	Anyag	CAS-szám	STTA-vizsgálat (1)			VM7Luc ER TA vizsgálat (2)		Osztályozás alapját képező adatforrás (4)		
			ER TA aktivitás	PC_{10} érték (M)	PC_{50} érték (b) (M)	ER TA aktivitás	EC_{50} érték (b), (3) (M)	Egyéb ER TA-k (c)	ER- kötés	Uterotrofikus
1	17ß-ösztradiol (a)	50-28-2	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POZ	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POZ (227/227)	POZ	POZ
2	17α-ösztradiol (a)	57-91-0	POZ	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POZ	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POZ (11/11)	POZ	POZ
3	17α-etinilösztradiol (a)	57-63-6	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POZ	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POZ (22/22)	POZ	POZ
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POZ	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POZ	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POZ (2/2)	NT	NT
5	19-norteszto szteron (a)	434-22-0	POZ	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POZ	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POZ (4/4)	POZ	POZ
6	4-kumolfenol (a)	599-64-4	POZ	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POZ	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POZ (5/5)	POZ	NT
7	4-*terc*-oktilfenol (a)	140-66-9	POZ	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POZ	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POZ (21/24)	POZ	POZ
8	Apigenin (a)	520-36-5	POZ	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POZ	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POZ (26/26)	POZ	NT
9	Atrazin (a)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Biszfenol-A (a)	80-05-7	POZ	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POZ	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POZ (65/65)	POZ	POZ
11	Biszfenol-B (a)	77-40-7	POZ	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POZ	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POZ (6/6)	POZ	POZ
12	Butilbenzil-ftalát (a)	85-68-7	POZ	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POZ	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POZ (12/14)	POZ	NEG

▼M8

	Anyag	CAS-szám	STTA-vizsgálat (1)			VM7Luc ER TA vizsgálat (2)		Osztályozás alapját képező adatforrás (4)		
			ER TA aktivitás	PC_{10} érték (M)	PC_{50} érték (b) (M)	ER TA aktivitás	EC_{50} érték (b), (3) (M)	Egyéb ER TA-k (c)	ER- kötés	Uterotrofikus
13	Kortikoszteron (a)	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG (6/6)	NEG	NT
14	Kumesztrol (a)	479-13-0	POZ	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POZ	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POZ (30/30)	POZ	NT
15	Daidzein (a)	486-66-8	POZ	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POZ	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POZ (39/39)	POZ	POZ
16	Dietilstilbösztrol (a)	56-53-1	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POZ	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POZ (42/42)	POZ	NT
17	Di-n-butil-ftalát	84-74-2	POZ	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POZ	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POZ (6/11)	POZ	NEG
18	Etilparabén	120-47-8	POZ	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(nincs PC_{50})	POZ	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POZ		NT
19	Esztron (a)	53-16-7	POZ	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POZ	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POZ (26/28)	POZ	POZ
20	Geniszten (a)	446-72-0	POZ	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POZ	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POZ (100/102)	POZ	POZ
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kempferol (a)	520-18-3	POZ	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POZ	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POZ (23/23)	POZ	NT
23	Kepone (a)	143-50-0	POZ	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POZ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POZ (14/18)	POZ	NT
24	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	*meso*-Hexestrol (a)	84-16-2	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POZ	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POZ (4/4)	POZ	NT
27	Metil-tesztoszteron (a)	58-18-4	POZ	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POZ	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POZ (5/6)	POZ	NT

▼M8

	Anyag	CAS-szám	STTA-vizsgálat (1)			VM7Luc ER TA vizsgálat (2)		Osztályozás alapját képező adatforrás (4)		
			ER TA aktivitás	PC_{10} érték (M)	PC_{50} érték (b) (M)	ER TA aktivitás	EC_{50} érték (b), (3) (M)	Egyéb ER TA-k (c)	ER- kötés	Uterotrofikus
28	Morin	480-16-0	POZ	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POZ	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POZ (2/2)	POZ	NT
29	Noretinodrel (a)	68-23-5	POZ	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POZ	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POZ (5/5)	POZ	NT
30	*p,p*'-Metoxiklór (a)	72-43-5	POZ	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(nincs PC_{50}) ()	POZ	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POZ (24/27)	POZ	POZ
31	Fenobarbitál (a)	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
32	Reszerpin	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
33	Spironolakton (a)	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
34	Tesztoszteron	58-22-0	POZ	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POZ	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POZ (5/10)	POZ	NT

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; M = moláris; EC_{50} = a vizsgálati anyag maximális tényleges hatásának felét kiváltó koncentráció; NEG = negatív; POZ = pozitív; NT = nem tesztelt; PC^{10} (és PC_{50}) = a vizsgálati anyagnak az a koncentrációja, amelynél a kiváltott válasz a pozitív kontroll (E2, 1 nm) egyes lemezeken indukált válaszának 10 %-a (illetve PC_{50} esetében 50 %-a).

(a) A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatban tesztelt, gyakori előfordulású, ösztrogénreceptor agonistának vagy negatívnak minősített anyagok, amelyeket a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányban a pontosság értékelésére használtak (az ICCVAM VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatról szóló értékelő jelentése, 4-1. táblázat (3)).

(b) Mivel nem álltak fent citotoxicitásból vagy oldhatatlanságból fakadó korlátok, a maximális vizsgált koncentráció 1×10^{-5} M (stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat) és 1×10^{-3} M (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat) volt.

(c) A zárójelben feltüntetett szám a pozitív (POZ) vagy negatív (NEG) kategóriába sorolt vizsgálati eredmények és a referenciavizsgálatok teljes számának aránya.

(1) A „Jelentéstervezet az ösztrogén hatású aktivitás észlelésére szolgáló stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat elővalidálásáról és laborközi validálásáról – a humán ösztrogénreceptor alfa által közvetített riportergén hER-HeLa-9903 sejtvonallal történő vizsgálata" (2) által közölt értékek.

(2) Az ICCVAM „LUMI-CELL® ösztrogénreceptor (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: ösztrogénreceptorok agonistáinak és antagonistáinak azonosítására szolgáló *in vitro* módszer" című, vizsgálati módszert értékelő jelentése (3).

(3) Az átlagos EC_{50} értékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok (XDS, ECVAM és Hijosi) által szolgáltatott adatok alapján kerültek meghatározásra (3).

(4) Az ösztrogénreceptor agonista és negatív besorolás alapját az ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálati módszerek felülvizsgálatára vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumokban (31) szereplő információk és az ICCVAM felülvizsgálati háttérdokumentumainak véglegesítése után kiadott és átdolgozott publikációkban közzétett információk képezik (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Megjegyzések: A vizsgálati módszer alapján végzett egyes vizsgálatok mérőszámai eltérőek. Bizonyos helyzetekben – teljes dózis-válasz görbe hiányában – nem lehet meghatározni az EC_{50} értékét. Bár a PC_{10} érték a stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat fő mérőszámainak egyike, előállhatnak további helyzetek, ahol a PC_X fog hasznos információt nyújtani.

▼M8

2. táblázat

A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat eredményeinek összevetése azon anyagok vonatkozásában, amelyeket mindkét antagonista vizsgálatban teszteltek, és ösztrogénreceptor antagonistaként (POZ) vagy negatívként (NEG) azonosítottak

	Anyag ([a])	CAS-szám	ER STTA-vizsgálat ([1])		VM7Luc ER TA vizsgálat ([2])		ER STTA vizsgált anyagok hatása ([4])	ICCVAM ([5]) konszenzuson alapuló besorolás	MeSH ([6]) Kémiai osztály	Termékosztály ([7])
			ER TA aktivitás	IC_{50} érték ([b]) (M)	ER TA aktivitás	IC_{50} érték ([b]), ([3]) (M)				
1	4-hidroxitamoxifén	68047-06-3	POZ	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POZ	$2{,}08 \times 10^{-7}$	mérsékelten POZ	POZ	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
2	Dibenzo[a,h]antracén	53-70-3	POZ	Nincs IC_{50}	POZ	Nincs IC_{50}	POZ	FP	Policiklikus vegyület	Laboratóriumi vegyi anyag, természetes termék
3	Mifepriszton	84371-65-3	POZ	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG	—	enyhén POZ	NEG	Szteroid	Gyógyszer
4	Raloxifen-hidroklorid	82640-04-8	POZ	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POZ	$1{,}19 \times 10^{-9}$	mérsékelten POZ	POZ	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
5	Tamoxifén	10540-29-1	POZ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POZ	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POZ	POZ	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
6	17β-ösztradiol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	FN	FN	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag

▼M8

	Anyag ([a])	CAS-szám	ER STTA-vizsgálat ([1])		VM7Luc ER TA vizsgálat ([2])		ER STTA vizsgált anyagok hatása ([4])	ICCVAM ([5]) konszenzuson alapuló besorolás	MeSH ([6]) Kémiai osztály	Termékosztály ([7])
			ER TA aktivitás	IC_{50} érték ([b]) (M)	ER TA aktivitás	IC_{50} érték ([b]), ([3]) (M)				
7	Apigenin	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heterociklikus vegyület	Festék, természetes termék, gyógyszerészeti köztes termék
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	FN	Heterociklikus vegyület	Gyomirtó szer
9	Di-n-butil-ftalát	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Észter, ftálsav	Kozmetikai összetevő, ipari vegyi anyag, lágyítószer
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	nem vizsgált	FN	Heterociklikus vegyület, pirimidin	Gombaölő szer
11	Flavon	525-82-6	NEG	—	NEG	—	FN	FN	Flavonid, heterociklikus vegyület	Természetes termék, gyógyszer
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	FN	Amid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
13	Geniszten	446-72-0	NEG	—	NEG	—	FN	NEG	Flavonid, heterociklikus vegyület	Természetes termék, gyógyszer

▼M8

	Anyag ([a])	CAS-szám	ER STTA-vizsgálat ([1])		VM7Luc ER TA vizsgálat ([2])		ER STTA vizsgált anyagok hatása ([4])	ICCVAM ([5]) konszenzuson alapuló besorolás	MeSH ([6]) Kémiai osztály	Termékosztály ([7])
			ER TA aktivitás	IC_{50} érték ([b]) (M)	ER TA aktivitás	IC_{50} érték ([b]), ([3]) (M)				
14	p-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	nem vizsgált	NEG	Fenol	Köztes vegyi anyag
15	Rezveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	FN	NEG	Szénhidrogén (ciklikus)	Természetes termék

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; M = moláris; IC_{50} = a vizsgálati anyag maximális gátló hatásának felét kiváltó koncentráció; NEG = negatív; FN = feltételezhetően negatív; POZ = pozitív; FP = feltételezhetően pozitív.

([a]) A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatban tesztelt, gyakori előfordulású, ösztrogénreceptor antagonistának vagy negatívnak minősített anyagok, amelyeket a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányban a pontosság értékelésére használtak (2) (3).

([b]) Mivel nem álltak fent citotoxicitásból vagy oldhatatlanságból fakadó korlátok, a maximális vizsgált koncentráció 1×10^{-3} M (stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat) és 1×10^{-5} M (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat) volt.

([1]) Ösztrogénreceptorok által közvetített aktivitás észlelésére szolgáló, stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat validálási jelentése, B rész (2).

([2]) Az ICCVAM „LUMI-CELL® ösztrogénreceptor (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: ösztrogénreceptorok agonistáinak és antagonistáinak azonosítására szolgáló *in vitro* módszer” című, vizsgálati módszert értékelő jelentése (3).

([3]) Az átlagos IC_{50} értékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok (XDS, ECVAM és Hijosi) által szolgáltatott adatok alapján kerültek meghatározásra (3).

([4]) A vizsgálat anyagok ösztrogénreceptor stabilan transzfektált transzaktivációs aktivitására az ösztrogénreceptor-kötődési vizsgálat CERI által dokumentált adataiból, az uterotrofikus vizsgálatból és a szabadon hozzáférhető szakirodalomban (2) szereplő információkból ismert hatásuk alapján következtettek.

([5]) Az ösztrogénreceptor antagonista vagy negatív besorolás alapját az ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálatok felülvizsgálatára vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumokban (31) szereplő információk és az ICCVAM felülvizsgálati háttérdokumentumainak véglegesítése után kiadott és átdolgozott publikációkban közzétett információk képezik (2) (3) (18) (31).

([6]) Az anyagok egy vagy több kémiai osztályba sorolása az Egyesült Államok nemzetközileg elismert szabványosított osztályozási rendszere, a Medicine’s Medical Subject Headings (MeSH) nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Az anyagok egy vagy több termékosztályba sorolása az Egyesült Államok Medicine’s Hazardous Substances Data Bank nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI

A vizsgálat alapvető összetevői

11. Ez a vizsgálati módszer olyan vizsgálatokra alkalmazható, amelyek stabilan transzfektált vagy endogén ösztrogénreceptor α-t, valamint egy stabilan transzfektált, egy vagy több ösztrogén válaszelemmel szabályozott riportergén konstrukciót használnak, amelyben azonban más receptorok, például ösztrogénreceptor β is jelen lehet. Ezek a vizsgálat alapvető összetevői.

Kontrollok

12. Meg kell határozni az egyes agonista és antagonista vizsgálatokhoz javasolt, párhuzamosan tesztelt referenciaszabvány alapját. A párhuzamos kontrollok (negatív, pozitív és oldószeres) arra szolgálnak, hogy igazolják a vizsgálat tesztkörülmények közötti megfelelő működését, és megteremtsék az alapját az egyes kísérletek összevetésének; általában részét képezik a szóban forgó kísérlet elfogadhatósági kritériumainak (1).

Standard minőség-ellenőrzési eljárások

13. Az egyes vizsgálatokhoz meghatározott standard minőség-ellenőrzési eljárásokat kell végezni annak biztosítása érdekében, hogy a sejtvonalak több passzálást követően is stabilak maradjanak, mikoplazmától (vagyis bakteriális fertőzéstől) mentesek legyenek, és később is megismételhetőek legyenek az ösztrogénreceptor által közvetített várt válaszreakciók. Emellett ellenőrizni kell a sejtvonalak megfelelő azonosságát, valamint az egyéb fertőző ágensek (pl. gombák, élesztő és vírusok) hiányát.

A laboratórium jártasságának igazolása

14. Mielőtt ismeretlen vegyi anyagokat tesztelnének az e vizsgálati módszerhez kapcsolódó bármely vizsgálattal, a laboratóriumoknak igazolniuk kell az adott vizsgálat alkalmazásában szerzett jártasságukat. A jártasság igazolásához minden laboratóriumnak tesztelnie kell az agonista vizsgálat 3. táblázatban feltüntetett 14 jártassági tesztanyagát és az antagonista vizsgálat 4. táblázatban szereplő 10 jártassági tesztanyagát. E jártassági vizsgálatok bizonyítják a vizsgálati rendszer reagálóképességét is. A jártassági tesztanyagok jegyzéke az ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatok teljesítményszabványaiban (6) megadott referenciaanyagok egy csoportjából tevődik össze. Ezek az anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők, olyan kémiai osztályokat képviselnek, amelyeknél gyakori az ösztrogénreceptor agonista vagy antagonista aktivitás, az ösztrogénreceptor agonistáktól és antagonistáktól elvárt potenciál megfelelő tartományát képviselik (erőstől a gyengéig) és vannak közöttük negatív besorolású anyagok is. A jártassági tesztanyagok vizsgálatát legalább kétszer, különböző napokon meg kell ismételni. A jártasság az egyes jártassági tesztanyagok megfelelő (pozitív/negatív) osztályba sorolásával igazolható. A vizsgálat elsajátítása során a jártassági vizsgálatot minden technikusnak meg kell ismételnie. Sejttípustól függően e jártassági tesztanyagok némelyike szelektív ösztrogénreceptor modulátorként viselkedhet, vagyis kifejthet agonista és antagonista aktivitást is. Azonban a jártassági tesztanyagok 3. és 4. táblázatban ismertetett besorolása ismert domináns aktivitásuk alapján történt, azt kell figyelembe venni a jártassági értékelés során.

15. A vizsgálat teljesítményének igazolása és minőség-ellenőrzés céljából minden laboratóriumnak referenciaszabványok (pl. 17β-ösztradiol és tamoxifén), kontrollként szolgáló pozitív és negatív vegyi anyagok, valamint oldószeres kontrollanyagok (pl. DMSO) adataiból álló agonista és antagonista adatbázisokat kell létrehozniuk. Az induló adatbázist legalább 10 független agonista (pl. 17β-ösztradiol) és 10 független antagonista (pl. tamoxifén) vizsgálatmenet alapján kell létrehozni. Az adatbázist ki kell bővíteni e referenciaszabványok és oldószeres kontrollanyagok későbbi elemzéseiből származó eredményekkel, hogy az idő múlásával is biztosítani lehessen a biológiai vizsgálat konzisztenciáját és teljesítményét.

▼M8

3. táblázat

Az agonista vizsgálathoz használatos jártassági tesztanyagok (14) jegyzéke (1)

Szám (8)	Anyag	CAS-szám	Várt válasz (2)	STTA-vizsgálat			VM7Luc ER TA vizsgálat		MeSH kémiai osztály (6)	Termékosztály (7)
				PC_{10} érték (M) (3)	PC_{50} érték (M) (3)	Vizsgálati koncentrációtartomány (M)	VM7Luc EC_{50} érték (M) (4)	Legmagasabb konc. dózisbehatárláshoz (M) (5)		
14	Dietilstilbösztrol	56-53-1	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	10^{-14}–10^{-8}	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
12	17α-ösztradiol	57-91-0	POZ	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	10^{-11}–10^{-5}	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
15	*meso*-Hexestrol	84-16-2	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	10^{-11}–10^{-5}	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Szénhidrogén (ciklikus), fenol	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
11	4-*terc*-oktilfenol	140-66-9	POZ	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	10^{-11}–10^{-5}	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenol	Köztes vegyi anyag
9	Geniszten	446-72-0	POZ	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	10^{-11}–10^{-5}	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonid, heterociklikus vegyület	Természetes termék, gyógyszer
6	Biszfenol-A	80-05-7	POZ	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	10^{-11}–10^{-5}	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenol	Köztes vegyi anyag

▼M8

Szám ([8])	Anyag	CAS-szám	Várt válasz ([2])	STTA-vizsgálat			VM7Luc ER TA vizsgálat		MeSH kémiai osztály ([6])	Termékosztály ([7])
				PC_{10} érték (M) ([3])	PC_{50} érték (M) ([3])	Vizsgálati koncentrációtartomány (M)	VM7Luc EC_{50} érték (M) ([4])	Legmagasabb konc. dózisbehatárláshoz (M) ([5])		
2	Kempferol	520-18-3	POZ	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	10^{-11}–10^{-5}	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonid, heterociklikus vegyület	Természetes termék
3	Butilbenzil-ftalát	85-68-7	POZ	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	10^{-11}–10^{-5}	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Karbonsav, észter, ftálsav	Lágyítószer, ipari vegyi anyag
4	*p,p*'-Methoxyklór	72-43-5	POZ	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	10^{-11}–10^{-5}	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Szénhidrogén (halogénezett)	Növényvédő szer, állatgyógyászati hatóanyag
1	Etilparabén	120-47-8	POZ	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	10^{-11}–10^{-5}	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Karbonsav, fenol	Gyógyszer, konzerváló szer
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	—	10^{-10}–10^{-4}	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Heterociklikus vegyület	Gyomirtó szer
20	Spironolakton	52-01-7	NEG	—	—	10^{-11}–10^{-5}	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Lakton, szteroid	Gyógyszer
21	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	10^{-11}–10^{-5}	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Heterociklikus vegyület	Gyógyszer

▼M8

Szám ([8])	Anyag	CAS-szám	Várt válasz ([2])	STTA-vizsgálat			VM7Luc ER TA vizsgálat		MeSH kémiai osztály ([6])	Termékosztály ([7])
				PC_{10} érték (M) ([3])	PC_{50} érték (M) ([3])	Vizsgálati koncentrációtartomány (M)	VM7Luc EC_{50} érték (M) ([4])	Legmagasabb konc. dózisbehatárláshoz (M) ([5])		
22	Reszerpin	50-55-5	NEG	—	—	10^{-11}–10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Heterociklikus vegyület, indol	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; EC_{50} = a vizsgálati anyag maximális tényleges hatásának felét kiváltó koncentráció; NEG = negatív; POZ = pozitív; PC^{10} (és PC_{50}) = a vizsgálati anyagnak az a koncentrációja, amelynél a kiváltott válasz a pozitív kontroll (E2, 1 nm) egyes lemezeken indukált válaszának 10 %-a (illetve PC_{50} esetében 50 %-a).

([1]) Az ösztrogénreceptor agonista aktivitás pozitív vagy negatív besorolásának alapját az ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálatok felülvizsgálatára vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumok (31) és az ICCVAM felülvizsgálati háttérdokumentumainak véglegesítése után kiadott és átdolgozott referenciavizsgálatokból nyert empirikus adatok és egyéb információk képezik (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

([2]) A „Jelentéstervezet az ösztrogén hatású aktivitás észlelésére szolgáló stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat elővalidálásáról és laborközi validálásáról – a humán ösztrogénreceptor alfa által közvetített riportergén hER-HeLa-9903 sejtvonallal történő vizsgálata” (30) által közölt értékek.

([3]) Az átlagos EC_{50} értékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok (XDS, ECVAM és Hijosi) által szolgáltatott adatok alapján kerültek meghatározásra (3).

([4]) A jelzett koncentrációértékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálása során (dózisbehatárolás céljából) vizsgált legmagasabb koncentrációk. Amennyiben az egyes laboratóriumok eltérő koncentrációértékeket alkalmaztak, a legmagasabb koncentráció került feltüntetésre. Lásd az ICCVAM „LUMI-CELL® ösztrogénreceptor (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: a vegyi anyagok humán ösztrogénreceptorokra kifejtett agonista és antagonista aktivitásának azonosítására szolgáló *in vitro* vizsgálat” című (3), vizsgálati módszert értékelő jelentésének 4-10. táblázatát.

([5]) Az anyagok egy vagy több kémiai osztályba sorolása az Egyesült Államok nemzetközileg elismert szabványosított osztályozási rendszere, a Medicine’s Medical Subject Headings (MeSH) nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Az anyagok egy vagy több termékosztályba sorolása az Egyesült Államok Medicine’s Hazardous Substances Database nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

([7]) A teljesítményszabványok (6) 1. táblázatából (az ösztrogénreceptor agonisták meghatározása pontosságának értékelésére használt referencia vegyi anyagok (22) jegyzéke).

([8]) Amennyiben egy adott jártassági tesztanyag kereskedelmi forgalmazása megszűnik, akkor használható helyette egy azonos besorolású, hasonló potenciállal és hatásmechanizmussal rendelkező, azonos kémiai osztályba tartozó anyag.

▼M8

4. táblázat

Az antagonista vizsgálathoz használatos jártassági tesztanyagok (10) jegyzéke

	Anyag ([a])	CAS-szám	ER STTA-vizsgálat ([1])			VM7Luc ER TA vizsgálat ([2])			ER STTA ([1]) vizsgált anyagok hatása	ICCVAM ([5]) konszenzuson alapuló besorolás	MeSH ([6]) Kémiai osztály	Termékosztály ([7])
			ER TA aktivitás	IC_{50} (M)	Vizsgálati koncentrációtartomány (M)	ER TA aktivitás	IC_{50} ([3]) (M)	Legmagasabb konc. dózisbehatárolásához (M) ([4])				
1	4-hidroxitamoxifén	68047-06-3	POZ	$3{,}97 \times 10^{-9}$	10^{-12} –10^{-7}	POZ	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	mérsékelten POZ	POZ	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
2	Raloxifen-hidroklorid	82640-04-8	POZ	$7{,}86 \times 10^{-10}$	10^{-12} –10^{-7}	POZ	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	mérsékelten POZ	POZ	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
3	Tamoxifén	10540-29-1	POZ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	10^{-10} –10^{-5}	POZ	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POZ	POZ	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer
4	17β-ösztradiol	50-28-2	NEG	—	10^{-9} –10^{-4}	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	negatívnak kell lennie (*)	FN	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
5	Apigenin	520-36-5	NEG	—	10^{-9} –10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterociklikus vegyület	Festék, természetes termék, gyógyszerészeti köztes termék
6	Di-n-butil-ftalát	84-74-2	NEG	—	10^{-8} –10^{-3}	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Észter, ftálsav	Kozmetikai összetevő, ipari vegyi anyag, lágyítószer

▼M8

	Anyag ([a])	CAS-szám	ER STTA-vizsgálat ([1])			VM7Luc ER TA vizsgálat ([2])			ER STTA ([1]) vizsgált anyagok hatása	ICCVAM ([5]) konszenzuson alapuló besorolás	MeSH ([6]) Kémiai osztály	Termékosztály ([7])
			ER TA aktivitás	IC_{50} (M)	Vizsgálati koncentrációtartomány (M)	ER TA aktivitás	IC_{50} ([3]) (M)	Legmagasabb konc. dózisbehatárolásához (M) ([4])				
7	Flavon	525-82-6	NEG	—	10^{-8} –10^{-3}	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	negatívnak kell lennie (*)	FN	Flavonid, heterociklikus vegyület	Természetes termék, gyógyszer
8	Geniszten	446-72-0	NEG	—	10^{-9} –10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	negatívnak kell lennie (*)	NEG	Flavonid, heterociklikus vegyület	Természetes termék, gyógyszer
9	p-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	10^{-9} –10^{-4}	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	nem vizsgált	NEG	Fenol	Köztes vegyi anyag
10	Rezveratrol	501-36-0	NEG	—	10^{-8} –10^{-3}	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	negatívnak kell lennie (*)	NEG	Szénhidrogén (ciklikus)	Természetes termék

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; M = moláris; IC_{50} = a vizsgálati anyag maximális gátló hatásának felét kiváltó koncentráció; NEG = negatív; FN = feltételezhetően negatív; POZ = pozitív.

(*) a szakirodalmi áttekintésben negatívként besorolva (2).

([a]) A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatban tesztelt, gyakori előfordulású, ösztrogénreceptor antagonistának vagy negatívnak minősített anyagok, amelyeket a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányban a pontosság értékelésére használtak (2) (3).

([1]) ösztrogénreceptorok által közvetített aktivitás észlelésére szolgáló, stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat validálási jelentése, B rész (2).

([2]) Az ICCVAM „LUMI-CELL ösztrogénreceptor (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: ösztrogénreceptorok agonistáinak és antagonistáinak azonosítására szolgáló *in vitro* módszer” című, vizsgálati módszert értékelő jelentése (3).

([3]) Az átlagos IC_{50} értékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok (XDS, ECVAM és Hijosi) által szolgáltatott adatok alapján kerültek meghatározásra (3).

([4]) A jelzett koncentrációértékek a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálása során (dózisbehatárolás céljából) vizsgált legmagasabb koncentrációk. Amennyiben az egyes laboratóriumok eltérő koncentrációértékeket alkalmaztak, a legmagasabb koncentráció került feltüntetésre. Lásd az ICCVAM vizsgálati módszert értékelő jelentésének 4-11. táblázatát. A „LUMI-CELL® ER (VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs) vizsgálati módszer: a vegyi anyagok humán ösztrogénreceptorokra kifejtett agonista és antagonista aktivitásának azonosítására szolgáló *in vitro* vizsgálat” című (3), vizsgálati módszert értékelő jelentésébe.

([5]) Az ösztrogénreceptor antagonista vagy negatív besorolás alapját az ösztrogénreceptor-kötődési és transzaktivációs vizsgálati módszerek felülvizsgálatára vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumokban (31) szereplő információk és az ICCVAM felülvizsgálati háttérdokumentumainak véglegesítése után kiadott és átdolgozott publikációkban közzétett információk képezik (2) (3) (18) (31).

([6]) Az anyagok egy vagy több kémiai osztályba sorolása az Egyesült Államok nemzetközileg elismert szabványosított osztályozási rendszere, a Medicine’s Medical Subject Headings (MeSH) nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Az anyagok egy vagy több termékosztályba sorolása az Egyesült Államok Medicine’s Hazardous Substances Data Bank nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

A vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumai

16. A vizsgálatmenetek elfogadására vagy elvetésére az egyes kísérletekben alkalmazott referenciaszabványok és kontrollanyagok eredményeinek értékelése alapján kerül sor. A referenciaszabványok PC_{50} (EC_{50}) vagy IC_{50} értékének meg kell felelnie a választott vizsgálat elfogadhatósági kritériumainak (ezeket a stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat esetében a 2. függelék, a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat esetében a 3. függelék tartalmazza), és minden elfogadott kísérletben megfelelően kell besorolni az összes pozitív/negatív kontrollanyagot. A vizsgálat következetes végrehajtásának képességét bizonyítani kell azáltal, hogy a laboratóriumok adatbázist hoznak létre és tartanak fent a referenciaszabványok és kontrollanyagok adataiból (lásd a 15. pontot). A laboratóriumon belüli reprodukálhatóság mérésére használhatók a referenciaszabványok átlagához illesztett, több kísérletből származó paraméterekből álló görbe standard deviációi (SD) vagy variációs koefficiensei (CV). Ezenkívül érvényesülniük kell az elfogadhatósági kritériumokra vonatkozó alábbi elveknek is:

— Elegendő mennyiségű adattal kell rendelkezni ahhoz, hogy számszerűen értékelni lehessen az ösztrogénreceptor aktivitást (agonista vizsgálat esetén) vagy gátlást (antagonista vizsgálat esetén) (vagyis a hatékonyságot és a potenciált).

— A megfelelő érzékenység biztosítása érdekében a referenciaösztrogén referenciakoncentrációjánál kifejtett átlagos riporter aktivitásnak – a vivőanyagos (oldószeres) kontroll esetén tapasztalt aktivitáshoz képest – el kell érnie legalább a vizsgálatokban meghatározott minimumszintet. A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat esetén ez a minimumszint az egyes lemezeken vizsgált vivőanyagos kontrollok átlagának négyszerese.

— A vizsgált koncentrációknak a vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági tartományán belül kell maradniuk és nem okozhatnak citotoxicitást.

Az adatok elemzése

17. A válaszok pozitív vagy negatív kategóriába sorolásakor az egyes vizsgálatokhoz meghatározott adatértelmezési eljárásra kell támaszkodni.

18. Az elfogadhatósági kritériumok (16. pont) teljesítése jelzi a vizsgálat megfelelő működését, de nem garantálja az egyes vizsgálatmenetek adatainak pontosságát. Az adatok pontosságát az jelzi a legjobban, ha az első vizsgálatmenet eredményei megismételhetők. Amennyiben két vizsgálatmenet bizonyította az eredmény reprodukálhatóságát (például egy adott vizsgálati vegyi anyag mindkét vizsgálatmenetben pozitívnak bizonyult), akkor harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség.

19. Ha két vizsgálatmenet nem bizonyítja az eredmény reprodukálhatóságát (például egy vizsgálati vegyi anyag az egyik vizsgálatmenetben pozitívnak, a másikban negatívnak minősült), vagy magasabb fokú bizonyosságot kell szerezni a vizsgálat kimeneteléről, legalább három egymástól független vizsgálatmenetet kell lefolytatni. Ebben az esetben az osztályozás alapja a három vizsgálatmenet során kialakult két megegyező eredmény lesz.

Az adatok értelmezésének általános kritériumai

20. Jelenleg nincs általánosan elfogadott módszer az ösztrogénreceptor transzaktivációs adatok értelmezésére. Ugyanakkor az ösztrogénreceptor által közvetített aktivitás kvalitatív (pl. pozitív/negatív) és/vagy kvantitatív (pl. EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) értékelésének empirikus adatokon és megalapozott tudományos véleményen kell nyugodnia. A pozitív eredményeket lehetőség szerint jellemezni kell mind a vivőanyagos (oldószeres) kontrollhoz vagy referenciaösztrogénhez képest előidézett hatás mértékével, mind a hatást kiváltó koncentrációval (pl. EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} stb.).

▼**M8**

Vizsgálati jelentés

21. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálat:

— az alkalmazott vizsgálat;

— kontroll/referenciaszabvány/vizsgálati vegyi anyag;

— eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— A vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

— A vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;

— adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

Oldószer/vivőanyag:

— jellemzés (az anyag természete, forgalmazója és gyártási száma);

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása;

— A vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Sejtek:

— A sejtek típusa és eredete;

  • endogén módon fejeződött ki az ösztrogénreceptor? Ha nem, mely receptor(oka)t transzfektálták?;

  • az alkalmazott riporterkonstrukció(k) (ideértve a forrást);

  • transzfektálási módszer;

  • A stabil transzfekció fenntartására alkalmazott szelekció (ahol van);

  • A transzfektálási módszer releváns a stabil sejtvonalak szempontjából?

— sejtpasszálások száma (felolvasztástól);

▼**M8**

— passzált sejtek száma felolvasztáskor;

— A sejttenyészetek fenntartásának módszerei.

Vizsgálati körülmények:

— oldhatóság korlátai;

— az életképesség felmérésére alkalmazott módszer leírása;

— A közeg összetétele, CO_2-koncentráció;

— A vizsgálati vegyi anyag koncentrációi;

— A hozzáadott vivőanyag és vizsgálati vegyi anyag mennyisége;

— inkubációs hőmérséklet és páratartalom;

— A kezelés időtartama;

— sejtsűrűség a kezelés elején és annak időtartama alatt;

— pozitív és negatív referenciaszabványok;

— riporter reagensek (a termék neve, forgalmazója és gyártási száma);

— azok a kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatmenetek pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e.

Elfogadhatóság ellenőrzése:

— az egyes vizsgálati lemezek indukciós faktorai, illetve hogy az indukciós faktorok a dokumentált kontrollok alapján megfelelnek-e a vizsgálathoz szükséges minimumnak;

— az elfogadhatósági kritériumok tényleges értékei, pl. a párhuzamos pozitív kontrollok/referenciaszabványok $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ és Hill-meredekségi értékei.

Eredmények:

— nyers és normalizált adatok;

— az indukciós faktor maximális szintje;

— citotoxicitási adatok;

— ha létezik, a legkisebb hatásos koncentráció (LEC);

— adott esetben az RPC^{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} és/vagy EC_{50} értékek;

— amennyiben lehetséges, a koncentráció-válasz összefüggés;

▼M8

— statisztikai elemzések, ha végeztek ilyeneket, hiba- és megbízhatósági számításokkal (pl. SEM, SD, CV vagy 95 % CI), és annak leírása, hogy milyen módon kapták ezeket az értékeket.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(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.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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): p. 5367-73.

(5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): p. 67-82.

(6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20- 6.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): p. 1073-89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): p. 63- 6.

▼**M8**

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): p. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of *In vitro* and *In vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol*. Sci., 89(1): p. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): p. 91- 98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In vitro* and *In vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): p. 81-118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol,71(10): p. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol*. Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): p. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In vivo* and *In vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): p. 122-126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): p. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): p. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): p. 105-12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): p. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): p. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): p. 1460-1468.

▼**M8**

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): p. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: p. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3):p. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

▼M8

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS RÖVIDÍTÉSEK

Elfogadhatósági kritériumok: a kísérleti kontrollok és referenciaszabványok megfelelőségére vonatkozó minimális előírások. Ahhoz, hogy egy kísérlet érvényesnek minősüljön, meg kell felelni valamennyi elfogadhatósági kritériumnak.

Pontosság (egyezőség): a vizsgálati eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés eltérése. A vizsgálat megfelelőségének mutatója, és relevanciájának egyik szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezőség” szinonimájaként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket (1).

Agonista: olyan anyag, amely egy specifikus receptorhoz kötődve valamilyen választ, pl. transzkripciót vált ki.

Antagonista: a receptor ligandumok vagy vegyi anyagok azon típusa, amely egy receptorhoz kötődve nem vált ki biológiai válaszreakciót, hanem gátolja vagy tompítja az agonisták által indukált válaszokat.

Antiösztrogén aktivitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy gátolja az ösztrogénreceptorok által közvetített 17β-ösztradiol hatását.

Sejtmorfológia: egy szövettenyészetet tartalmazó lemez egyetlen lyukában lévő egyrétegű sejtek alakja és megjelenési formája. Az elhaló sejtek gyakran a normálistól eltérő sejtmorfológiával rendelkeznek.

CF: Az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére szolgáló fogalmi kerete.

Aktív szén/dextrán kezelés: a sejtkultúrához használt szérum kezelési módja. Az aktív szénnel/dextránnal végzett kezelés (szaknyelven „stripping-eljárás”) során eltávolítják az endogén hormonokat és hormonmegkötő fehérjéket.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Citotoxicitás: a sejtstruktúrát vagy a sejtfunkciót érő káros hatások, amelyek végső soron sejtpusztuláshoz vezethetnek, kimutatásához összevetik a lyukban növő sejtek számában az expozíciós időszak végére bekövetkezett csökkenést vagy a mérhető sejtfunkciók csökkenését a párhuzamos vivőanyagos kontrollal.

CV: variációs koefficiens.

DCC-FBS: dextránbevonatú aktív szénnel kezelt magzati borjú szérum.

DMEM: Dulbecco-féle módosított Eagle-tápoldat.

DMSO: dimetil-szulfoxid.

E2: 17β-ösztradiol

EC_{50}: a vizsgálati vegyi anyag maximális hatásának felét kiváltó koncentráció.

ED: az endokrin rendszer károsítása.

hERα: humán ösztrogénreceptor alfa.

▼**M8**

hERß: humán ösztrogénreceptor béta.

EFM: ösztrogénmentes közeg. A Dulbecco-féle módosított Eagle-tápoldat (DMEM) kiegészítve 4,5 % dextránbevonatú aktív szénnel kezelt magzati borjú szérummal, 1,9 % L-glutaminnal és 0,9 % penicillinnel és sztreptomicinnel.

ER: ösztrogénreceptor.

ERE: ösztrogén válaszelem.

Ösztrogénhatású aktivitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy a 17β-ösztradiolhoz hasonlóan ösztrogénreceptorokhoz kötődjön és aktiválja azokat. Ezzel a vizsgálati módszerrel a humán ösztrogénreceptor alfa által közvetített ösztrogénhatású aktivitás észlelhető.

ER TA: ösztrogénreceptor transzaktiváció.

FBS: magzati borjú szérum.

HeLa: humán méhnyakból származó halhatatlan sejtvonal.

HeLa9903: egy hERαα-val és egy luciferáz riportergénnel stabilan transzfektált HeLa-sejt szubklónja.

IC_{50}: egy gátló vizsgálati vegyi anyag maximális tényleges hatásának felét kiváltó koncentráció.

ICCVAM: alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottság.

Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság: annak a mutatója, hogy különböző minősített laboratóriumok milyen mértékben képesek ugyanazon protokoll alkalmazásával és ugyanazon anyagok vizsgálatával hasonló kvalitatív és kvantitatív eredményeket elérni. A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság az elővalidálási és validálási folyamat során kerül meghatározásra, és annak mértékét jelzi, hogy az adott vizsgálat mennyire sikeresen vihető át laboratóriumok között; más néven laboratóriumok közötti megismételhetőség (1).

Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság: annak meghatározása, hogy egy adott laboratóriumon belül dolgozó szakemberek milyen mértékben képesek egy meghatározott protokoll alapján különböző időpontokban sikeresen megismételni az eredményeket. Más néven „laboratóriumon belüli megismételhetőség” (1).

LEC: a legkisebb hatásos koncentráció a vizsgálati vegyi anyag azon legalacsonyabb koncentrációja, amely választ vált ki (vagyis a vizsgálati vegyi anyag legkisebb koncentrációja, amelynél az indukciós faktor statisztikailag eltér a párhuzamos vivőanyagos kontrolltól).

Me-too vizsgálat: olyan vizsgálatok köznapi elnevezése, amelyek strukturálisan és funkcionálisan hasonlóak egy validált és elfogadott, referenciaként szolgáló vizsgálati módszerhez. A hasonló vizsgálati módszer szinonimája.

MT: metallotionein.

MMTV: egér emlőtumor vírus.

OHT: 4-hidroxitamoxifén.

PBTG: teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás.

▼**M8**

PC (pozitív kontroll): erős hatást kifejtő anyag, lehetőség szerint 17β-ösztradiol, amelyet belefoglalnak minden vizsgálatba, hogy biztosítsák a vizsgálat megfelelő működését.

PC_{10}: a vizsgálati vegyi anyagnak az a koncentrációja, amelynél az agonista vizsgálat során mért aktivitás a pozitív kontroll (a stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálatnál 1nM E2) egyes lemezeken indukált maximális aktivitásának 10 %-a.

PC_{50}: a vizsgálati vegyi anyagnak az a koncentrációja, amelynél az agonista vizsgálat során mért aktivitás a pozitív kontroll (E2 a vizsgálati módszerben megadott referenciakoncentrációban) egyes lemezeken indukált maximális aktivitásának 50 %-a.

PC_{Max}: a vizsgálati vegyi anyag RPC_{Max} hatást kiváltó koncentrációja.

Teljesítményszabványok: validált vizsgálaton alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálat összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: (1) a vizsgálat alapvető összetevői; (2) a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer elfogadható teljesítményének igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és (3) a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, hasonló megbízhatósági és pontossági szintek, amelyeket a javasolt vizsgálatnak teljesítenie kell a minimális jegyzék referencia-vegyianyagainak felhasználásával történő értékelése során (1).

Jártassági tesztanyagok: a teljesítményszabványokban megadott referenciaanyagokon belüli alcsoport, amelyet a laboratóriumok felhasználhatnak a szabványosított vizsgálati módszerben való szakmai jártasságuk igazolására. Ezeket az anyagokat általában az alapján választják ki, hogy összességükben lefedik a válaszreakciók lehetséges tartományát, kereskedelmi forgalomban kaphatók és rendelkezésre állnak rájuk vonatkozó minőségi referenciaadatok.

Jártasság: annak igazolása, hogy a laboratórium képes megfelelően lefolytatni egy adott vizsgálatot, mielőtt ismeretlen anyagokat tesztelne.

Referenciaösztrogén (pozitív kontroll, PC): 17β-ösztradiol (E2, CAS-száma: 50-28-2).

Referenciaszabvány: egy adott vizsgálat megfelelőségének bizonyítására használt referenciaanyag. A stabilan transzfektált transzaktivációs és a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat referenciaszabványa a 17β-ösztradiol.

Vizsgálati referenciamódszerek: A 455. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás alapját képező vizsgálatok.

Relevancia: valamely vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálat pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (1).

Megbízhatóság: a vizsgálat laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg.

RLU: relatív fényegység.

RNS: ribonukleinsav.

RPC_{Max}: valamely vizsgálati vegyi anyag által előidézett maximális szintű válasz, amelyet ugyanazon lemezen vizsgált 1 nM mennyiségű E2 által kiváltott válasz százalékában adnak meg.

▼M8

RPMI: RPMI-1 640 tápoldat kiegészítve 0,9 % penicillinnel és sztreptomicinnel, valamint 8,0 % magzati borjú szérummal (FBS).

Vizsgálatmenet: egyszeri kísérlet, amelynek során értékelik a vizsgálat biológiai eredményére gyakorolt kémiai hatást. Minden vizsgálatmenet egy teljes kísérletnek felel meg, amelyet közös sejtkészletből származó, ugyanabban az időben replikátum lyukakba kiszélesztett sejteken végeznek el.

Független vizsgálatmenet: más sejtkészletből származó sejtekkel, frissen hígított vegyi anyagokkal, különböző napokon vagy ugyanazon a napon más szakemberek által végzett különálló, független kísérlet, amelynek során értékelik a vizsgálat biológiai eredményére gyakorolt kémiai hatást.

SD: standard deviáció.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálat pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálat relevanciájának megítélésében (1).

Specificitás: az összes olyan negatív/aktív anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálat pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálat relevanciájának megítélésében (1).

Stabil transzfekció: amikor a DNS-t olyan módon transzfektálják a tenyésztett sejtekbe, hogy az stabilan integrálódik a sejtek genomjába, lehetővé téve ezáltal a transzfektált gének stabil kifejeződését. A stabilan transzfektált sejtek klónjainak szelektálását stabil markerekkel végzik (pl. G418-rezisztencia alapján).

STTA-vizsgálat: stabilan transzfektált transzaktivációs vizsgálat, a HeLa 9 903 sejtvonalat alkalmazó ösztrogénreceptor alfa transzkripciós aktivációs vizsgálat.

Tanulmány: egyetlen, konkrét anyag meghatározott vizsgálattal való értékeléséhez végzett teljes körű kísérleti munka. A tanulmány magában foglal minden lépést, egyebek mellett a vizsgálati anyag vizsgálati közegben végzett hígítási tesztjeit, az előzetes dózistartomány-kereső vizsgálatmeneteket, az összes szükséges teljes körű vizsgálatmenetet, az adatok elemzését, a minőség-ellenőrzést és a toxicitás felmérését. A tanulmány lezárásakor lehetővé válik a vizsgálati vegyi anyag toxicitási célpontra kifejtett és az alkalmazott vizsgált által értékelt hatásának besorolása (pl. aktív, inaktív vagy nem meggyőző), valamint a pozitív referencia-vegyianyaghoz viszonyított potenciáljának megbecslése.

Anyag: a REACH-rendelet ([1]) értelmében az anyag természetes állapotban előforduló vagy gyártási folyamatból származó kémiai elem és vegyületei, amely az anyag stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott folyamatból származó szennyező anyagot is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető. Az ENSZ GHS (1) egy ehhez nagyon hasonló meghatározást alkalmaz.

TA (transzaktiváció): az mRNS szintézis elindítása egy specifikus kémiai jel, például az ösztrogén ösztrogénreceptorhoz való kötődésének hatására.

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 1907/2006/EK rendelete (2006. december 18.) a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH), az Európai Vegyianyag-ügynökség létrehozásáról, az 1999/45/EK irányelv módosításáról, valamint a 793/93/EGK tanácsi rendelet, az 1488/94/EK bizottsági rendelet, a 76/769/EGK tanácsi irányelv, a 91/155/EGK, a 93/67/EGK, a 93/105/EK és a 2000/21/EK bizottsági irányelv hatályon kívül helyezéséről (HL L 304., 2007.11.22., 1. o.).

▼M8

Vizsgálat: e vizsgálati módszer keretében a vizsgálat azon hitelesnek elfogadott módszertanok egyike, amelyek eleget tesznek a meghatározott teljesítési kritériumoknak. A vizsgálat összetevői közé tartozik például a specifikus sejtvonal a hozzá kapcsolódó tenyésztési körülményekkel, a vizsgálat elvégzéshez használt specifikus tápoldat, a lemez elrendezésének körülményei, a vizsgálati vegyi anyag elrendezése és hígítása, továbbá bármely más szükséges minőség-ellenőrzési intézkedés és a kapcsolódó adatkiértékelési lépések.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Transzkripció: mRNS szintézis.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyagok, komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

Validált vizsgálati módszer: olyan vizsgálat, amelynek az adott céllal kapcsolatos relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága validálási vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a validált vizsgálati módszer a javasolt felhasználási célra nem feltétlenül kínál megfelelő pontosságú és megbízhatóságú elfogadható eljárást (1).

Validálás: az az eljárás, amelynek révén megállapítják egy bizonyos megközelítés, módszer, vizsgálat, eljárás vagy értékelés adott célra való megbízhatóságát és relevanciáját (1).

VC (Vivőanyagos kontroll): a vizsgálati és a kontrollként szolgáló vegyi anyagok feloldására használt oldószert önmagában, az oldott vegyi anyag nélkül, vivőanyagként vizsgálják.

VM7: immortalizált adenokarcinoma sejtvonal, amely endogénen fejezi ki az ösztrogénreceptort.

VM7Luc4E2: a VM7Luc4E2 sejtvonal VM7 immortalizált humán adenokarcinoma sejtekből származik, amelyek endogén módon kifejezik az ösztrogénreceptor mindkét formáját (ERα és ERβ), és ezt a sejtvonalat stabilan transzfektálták a pGudLuc7 plazmiddal. Ez a plazmid az egér emlőtumor vírus (MMTV) promóter előtt négy szintetikus oligonukleotid kópián hordozza az ösztrogén válaszelemet, és a szentjánosbogár luciferáz gén expresszióját szabályozza.

Gyenge pozitív kontroll: a referencia-vegyianyagok jegyzékéből kiválasztott gyenge hatást kifejtő anyag, amelyet belefoglalnak minden vizsgálatba, hogy biztosítsák a vizsgálat megfelelő működését.

▼M8

2. függelék

STABILAN TRANSZFEKTÁLT HUMÁN ÖSZTROGÉNRECEPTOR A TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT VEGYI ANYAGOK ÖSZTROGÉNHATÁSÚ AGONISTA ÉS ANTAGONISTA AKTIVITÁSÁNAK ÉSZLELÉSÉRE HERA-HELA-9903 SEJTVONALBAN

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

1. Ez a transzaktivációs (TA) vizsgálat hERα-HeLa-9903 sejtvonalat használ a humán ösztrogénreceptor alfa (hERα) által közvetített ösztrogénhatású agonista aktivitás észlelésére. A stabilan transzfektált transzaktivációs (STTA) vizsgálat validálási tanulmányát a japán Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI) végezte el, hERα-HeLa-9903 sejtvonalat használva a humán ösztrogénreceptor alfa (hERα) által közvetített ösztrogénhatású agonista és antagonista aktivitás észlelésére, amely tanulmány bizonyította, hogy a vizsgálat tervezett felhasználása tekintetében releváns és megbízható (1).

2. A vizsgálat kifejezetten azt a célt szolgálja, hogy a kémiai lumineszcencia mint végpont mérése révén észlelje a hERα által közvetített transzaktivációt. Azonban beszámoltak arról, hogy az 1 μM-nél magasabb fitoösztrogén-koncentrációnál a luciferáz riportergén túlzott aktiválása miatt nem receptorok által közvetített lumineszcencia jelek észlelhetők (2) (3). Bár a dózis-válasz görbe arra utal, hogy az ER-rendszer ténylegesen alacsonyabb koncentrációknál aktiválódik, a magas fitoösztrogén-koncentráció mellett vagy feltehetőleg a luciferáz riportergént a fitoösztrogénhez hasonlóan túlzottan aktiváló vegyületek magas koncentrációja mellett kapott luciferáz-kifejeződést körültekintően meg kell vizsgálni stabilan transzfektált ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálati rendszerekben (1. függelék).

3. E vizsgálat szabályozási célra való alkalmazása előtt el kell olvasni az „ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS” és „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részt. Az ebben a vizsgálati iránymutatásban használt fogalmak és rövidítések meghatározását a 2.1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

4. A vizsgálat az ösztrogénreceptor ligandumhoz kötődésének jelzésére szolgál. A ligandum kötődését követően a receptor-ligandum komplex transzlokálódik a sejtmagba, ahol specifikus DNS válaszelemekhez kötődve transzaktivál egy szentjánosbogár luciferáz riportergént, ami megnöveli a luciferáz enzim celluláris kifejeződését. A luciferin egy szubsztrát, amit a luciferáz enzim átalakít és közben bioluminescens fény keletkezik, amely luminométerrel számszerűen mérhető. A luciferáz-aktivitás számos kereskedelmi forgalomban kapható vizsgálati készlettel gyorsan és költséghatékonyan értékelhető.

5. A vizsgálati rendszer humán méhnyakdaganatból származó hERα-HeLa-9903 sejtvonalat használ, két stabilan inzertált konstrukcióval: i. a hERα expressziós konstrukcióval (amely a teljes humán ösztrogénreceptort kódolja), és ii. egy szentjánosbogár luciferáz riporterkonstrukcióval, amely egy vitellogenin ösztrogén válaszelem ötször ismétlődő szakaszát tartalmazza hozzákapcsolva egy egér metallotionein promóter TATA-boxához. Az egér metallotionein promóter TATA-box génkonstrukció biztosítja a legjobb teljesítményt, ezért használata általánosan elterjedt. Következésképpen a hERα-HeLa-9903 sejtvonal képes mérni egy adott vizsgálati vegyi anyag azon képességét, hogy beindítja a humán ösztrogénreceptor alfa által irányított luciferáz gén kifejeződést.

▼M8

6. ösztrogénreceptor agonista vizsgálat esetén az adatok értelmezése azon alapul, hogy a vizsgálati vegyi anyag által előidézett maximális szintű válasz megegyezik-e vagy meghaladja-e a pozitív kontrollanyagként használt 17β-ösztradiol (E2) indukáláshoz alkalmazott maximális (1 nM) koncentrációja által keltett agonista válasz 10 %-át (vagyis a PC_{10} értékét). ösztrogénreceptor antagonista vizsgálat esetén az adatok értelmezése azon alapul, hogy a válasz előidézi-e a kiegészítő kontroll (25 pM E2) által kiváltott válaszhoz képest az aktivitás legalább 30 %-os csökkenését, citotoxicitás nélkül. Az adatok elemzésének és értelmezésének részleteivel a 34–48. pont foglalkozik.

ELJÁRÁS

Sejtvonalak

7. A vizsgálathoz stabilan transzfektált hERα-HeLa-9903 sejtvonalat kell használni. A sejtvonal egy anyagátadási megállapodás aláírását követően beszerezhető a japán Collection of Research Bioresources (JCRB) sejtbankból ([1]).

8. A vizsgálat során kizárólag mikoplazmamentesnek nyilvánított sejtek használhatók. A mikoplazma-fertőzés érzékeny detektálására az RT-PCR (valós idejű polimeráz láncreakció) módszer alkalmazandó (4) (5) (6).

A sejtvonal stabilitása

9. A sejtvonal stabilitásának nyomon követéséhez az agonista vizsgálat során referenciaszabványként E2-t, 17α-ösztradiolt, 17α-metiltesztoszteront és kortikoszteront kell használni, emellett a vizsgálat minden elvégzése során legalább egy alkalommal fel kell venni egy teljes koncentráció-válasz görbét az 1. táblázatban szereplő koncentrációtartományban, és az eredményeknek meg kell felelniük az 1. táblázatban feltüntetett eredményeknek.

10. Antagonista vizsgálat során minden vizsgálatmenetben párhuzamosan meg kell határozni két referenciaszabvány, a tamoxifén és a flutamid teljes koncentrációgörbéjét. Ellenőrizni kell továbbá, hogy e két vegyi anyagot a kvalitatív osztályozás során helyesen sorolták-e pozitív, illetve negatív kategóriába.

Sejttenyésztés és a leültetés körülményei

11. A sejteket fenolvörösmentes, 60 mg/l kanamicin antibiotikummal és 10 %-os dextránbevonatú aktív szénnel kezelt magzati borjú szérummal (DCC-FBS) kiegészített Eagle-féle minimum esszenciális tápoldatban (Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM), CO_2 inkubátorban (5 % CO_2), 37 ±1 °C-on kell fenntartani. 75–90 %-os konfluencia elérését követően a sejteket tovább kell oltani egy 100 mm-es sejttenyésztő edénybe, 10 ml térfogatban $0{,}4 \times 10^5$ –1 $\times 10^5$ sejt/ml sűrűségben. 10 %-os FBS-EMEM (vagyis DCC-FBS-sel kiegészített EMEM) sejtszuszpenziót kell készíteni, majd a sejteket egy mikrotiterlemez lyukaiba 1×10^4 sejt/(100 µl × lyuk) sűrűségben ki kell széleszteni. A vegyi anyaggal való kezelést megelőzően a sejteket 5 %-os CO_2-tartalmú inkubátorba n 37° ±1° C-on 3 órán át preinkubálni kell. A műanyag edénynek nem lehet ösztrogénhatású aktivitása.

12. A válasz integritása érdekében a fagyasztott sejtkultúra sejtjein legalább két, de legfeljebb 40 passzálást kell végrehajtani a kondicionált tápoldatban. A hERα-HeLa-9903 sejtvonal esetében ez három hónapnál kevesebb időt vesz igénybe. A nem megfelelő tenyésztési körülmények között növő sejtek hatékonysága csökkenhet.

([1]) JCRB sejtbank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japán Fax: +81-72-641-9812.

▼M8

13. A DCC-FBS elkészíthető a 2.2. függelékben leírtak szerint, de kereskedelmi forrásból is beszerezhető.

Elfogadhatósági kritériumok

Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálathoz használandó pozitív és a negatív referenciaszabványok

14. A tanulmány előtt és alatt a vizsgálati rendszer reakcióképességét ellenőrizni kell egy erős ösztrogén (E2), egy gyenge ösztrogén (17α-ösztradiol) és egy nagyon gyenge agonista (17α-metiltesztoszteron) megfelelő koncentrációkban való alkalmazásával, valamint egy negatív anyaggal (kortikoszteron). A validálási tanulmányból (1) származó elfogadható értéktartományokat a 1. táblázat ismerteti. E 4 párhuzamosan vizsgálandó referenciaszabványt bele kell foglalni minden kísérletbe, vizsgálatuk eredményének pedig az elfogadható határértékeken belül kell lennie. Ellenkező esetben meg kell határozni, hogy mi okból nem teljesültek az elfogadhatósági kritériumok (pl. a sejtek kezelése, a szérum és az antibiotikum minősége és koncentrációja), a vizsgálatot pedig meg kell ismételni. Az elfogadhatósági kritériumok teljesülése esetén az EC_{50}, a PC_{50} és a PC_{10} értékek minimális szórása érdekében törekedni kell a sejttenyésztésben részt vevő anyagok következetes használatára. A négy párhuzamosan vizsgált referenciaszabvány – amelyeket minden kísérletben vizsgálni kell (azonos körülmények között, ideértve az anyagokat, a sejtek passzálási számát és a technikusokat is) – biztosíthatja a vizsgálat érzékenységét, mivel a három pozitív referenciaszabvány PC_{10} értékének az elfogadhatósági tartományba kell esnie, csakúgy mint PC_{50} és EC_{50} értékeknek, ha meghatározható (lásd az 1. táblázatot).

1. táblázat

Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálathoz használandó négy referenciaszabvány elfogadhatósági tartománya

Elnevezés	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Hill-meredekség	Vizsgálati tartomány
17β-ösztradiol (E2) CAS-szám: 50-28-2	-11,4~-10,1	< -11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8}M
17α-ösztradiol CAS-szám: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10^{-12}~10^{-6}M
Kortikoszteron CAS-szám: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10}~10^{-4}M
17α-metiltesztoszteron CAS-szám: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10^{-11}~10^{-5}M

Az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálathoz használandó pozitív és negatív referenciaszabványok

15. A tanulmány előtt és alatt a vizsgálati rendszer reakcióképességét egy pozitív anyag (tamoxifén) és egy negatív anyag (flutamid) megfelelő koncentrációkban való alkalmazásával ellenőrizni kell. A validálási tanulmányból (1) származó elfogadható értéktartományokat a 2. táblázat ismerteti. E két párhuzamosan vizsgálandó referenciaszabványt bele kell foglalni minden kísérletbe, vizsgálatuk eredményét pedig a kritériumoknak megfelelően kell értékelni. Ha az eredmény nem elfogadható, meg kell határozni, hogy mi okból nem teljesültek a kritériumok (pl. a sejtek kezelése, a szérum és az antibiotikum minősége és koncentrációja), a vizsgálatot pedig meg kell ismételni. Emellett meg kell határozni a pozitív anyag (tamoxifén) IC_{50} értékét, és az eredménynek az elfogadható határértékeken belül kell lennie. Az elfogadhatósági kritériumok teljesülése esetén az IC_{50} értékének minimális szórása érdekében mindenképpen biztosítani kell a sejttenyésztésben részt vevő anyagok következetes használatát. A két párhuzamosan vizsgált referenciaszabvány – amelyeket minden kísérletben vizsgálni kell (azonos körülmények között, ideértve az anyagokat, a sejtek passzálási számát és a technikusokat) – képes biztosítani a vizsgálat érzékenységét (lásd a 2. táblázatot).

▼M8

2. táblázat

Az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálathoz használandó két referenciaszabvány kritériuma és elfogadhatósági tartománya

Elnevezés	Kritériumok	$LogIC_{50}$	Vizsgálati tartomány
Tamoxifén CAS-szám: 10540-29-1	Pozitív: meg kell határozni az IC_{50} értéket	-5,942 ~ -7,596	10^{-10} ~ 10^{-5} M
FlutamidCAS-szám: 13311-84-7	Negatív: nem kell meghatározni az IC_{30} értéket	—	10^{-10} ~ 10^{-5} M

Pozitív és vivőanyagos kontrollok

16. A pozitív kontrollt az ösztrogénreceptor agonista vizsgálat esetén (1 nM mennyiségű E2) és az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálat esetén (10 μM mennyiségű TAM) lemezenként legalább három ismétlésben kell végrehajtani. A vizsgálati vegyi anyag feloldására használt vivőanyagot vivőanyagos kontroll keretében lemezenként legalább három ismétlésben kell vizsgálni. Amennyiben a pozitív kontroll során a vizsgálati vegyi anyagétól eltérő vivőanyagot alkalmaznak, e vivőanyagos kontroll mellett egy másik vivőanyagos kontrollt kell végezni legalább három ismétlésben, a pozitív kontrollal azonos lemezen.

Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálat minőségi kritériumai

17. A pozitív kontroll (1 nM E2) során tapasztalt átlagos luciferáz-aktivitás minden lemezen legalább a vivőanyagos kontroll átlagértékének négyszerese legyen. E kritérium meghatározása a validálási tanulmány végpontértékeinek megbízhatóságán alapul (a dokumentált értékek négyszeres és harmincszoros között helyezkednek el).

18. A vizsgálat minőség-ellenőrzése szempontjából a párhuzamos pozitív kontroll (1 nM E2) PC_{10} értékének megfelelő indukciós faktor nagyobbnak kell lennie, mint a párhuzamos vivőanyagos kontroll indukciós faktora (=1) plusz a standard deviáció kétszerese (1+2SD). Rangsorolási célból a PC_{10} érték a statisztikai elemzéshez képest leegyszerűsítheti a szükséges adatelemzést. Bár a statisztikai elemzés információt nyújt a szignifikanciáról, nem szolgáltat a koncentráció alapján megállapított potenciálhoz hasonló kvantitatív paramétert, ezért rangsorolás céljára kevésbé alkalmas.

Az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálat minőségi kritériumai

19. A kiegészítő kontroll (25 pM mennyiségű E2) luciferáz-aktivitásának átlaga lemezenként legalább négyszerese legyen a vivőanyagos kontroll átlagértékének. E kritérium meghatározása a validálási tanulmány végpontértékeinek megbízhatóságán alapul.

20. A vizsgálat minőség-ellenőrzése szempontjából az 1 nM mennyiségű E2 relatív transzkripciós aktiválásának (RTA) meg kell haladnia a 100 %-ot, az 1 μM mennyiségű 4-hidroxitamoxifén (OHT) relatív transzkripciós aktiválás értékének kisebbnek kell lennie 40,6 %-nál, a 100 μM digitonin (Dig) relatív transzkripciós aktiválás értéke pedig nem haladhatja meg a 0 %-ot.

A laboratórium jártasságának igazolása (lásd a vizsgálati módszer „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részének 14. pontját, valamint 3. és 4. táblázatát).

Vivőanyag

21. Párhuzamos vivőanyagos kontrollként dimetil-szulfoxidot (DMSO) vagy más megfelelő oldószert kell használni, azonos koncentrációban a különböző pozitív és negatív kontrollok és a vizsgálati vegyi anyag tesztelése során. A vizsgálati vegyi anyagokat olyan oldószerben kell feloldani, amelyik szolubilizálja az adott vizsgálati vegyi anyagot és elegyedik a sejtek tápoldatával. A megfelelő vivőanyagok közé tartozik a víz, az etanol (95–100 %-os tisztaságban) és a dimetil-szulfoxid. Dimetil-szulfoxid használata esetén az anyag mennyisége nem haladhatja meg a 0,1 térfogatszázalékot. Minden vivőanyag esetében igazolni kell, hogy maximális alkalmazott térfogatuk nem fejt ki citotoxikus hatást és nem befolyásolja a vizsgálat teljesítményét.

▼M8

Vizsgálati vegyi anyagok előkészítése

22. Általában a vizsgálati vegyi anyagokat dimetil-szulfoxidban vagy más alkalmas oldószerben fel kell oldani, és ugyanazzal az oldószerrel sorozatban 1:10 arányban hígítani kell, elkészítve az oldatokat a tápoldattal való hígításhoz.

Oldhatóság és citotoxicitás: a dózisbehatárolás szempontjai

23. Elővizsgálatot kell végezni a vizsgálandó vegyi anyag megfelelő koncentrációtartományának meghatározására, illetve annak megállapítására, hogy a vizsgálati vegyi anyaggal kapcsolatban felmerül-e oldhatósági és citotoxicitási probléma. A vegyi anyagokat először a legmagasabb, vagyis 1 µl/ml, 1 mg/ml vagy 1 mM koncentrációig vizsgálják, melyek közül a legalacsonyabb a mérvadó. Az elővizsgálat során megfigyelt citotoxicitási szint vagy oldhatatlanság alapján az első végleges vizsgálatmenetben a legmagasabb elfogadható koncentrációtól (pl. 1 mM, 100 µM, 10 µM stb.) induló logaritmikus hígítási oldatsorozatban kell vizsgálni a vegyi anyagot, és fel kell jegyezni az esetlegesen tapasztalt zavarosságot, kicsapódást vagy citotoxicitást. A második, illetve ha szükséges a harmadik vizsgálatmenet koncentrációértékeit megfelelően ki kell igazítani, hogy jó koncentráció-válasz görbe alakuljon ki, és ki lehessen zárni azokat a koncentrációkat, amelyek oldhatatlannak bizonyultak vagy túlzott citotoxicitást idéztek elő.

24. Az ER-agonisták és ER-antagonisták esetében a magas szintű citotoxicitás szignifikánsan módosíthatja vagy megakadályozhatja a tipikusan szigmoid választ, ezért figyelembe kell venni az adatok értelmezésénél. Olyan citotoxicitási vizsgálati módszereket kell alkalmazni, amelyek információt nyújtanak a 80 %-os sejtéletképességről, a megfelelő vizsgálatot a laboratórium tapasztalata alapján kell kiválasztani.

25. Amennyiben a citotoxicitási vizsgálat eredményei azt jelzik, hogy a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja legalább 20 %-kal csökkenti a sejtszámot, ezt a koncentrációt citotoxikusnak kell tekinteni, és a citotoxikus vagy afeletti koncentrációkat ki kell zárni az értékelésből.

Vegyi anyaggal történő kezelés és a vizsgálati lemez elrendezése

26. A vegyi anyag hígításának elkészítése (1. és 2. lépés) és a sejtek kezelése (3. lépés) az alábbiak szerint is elvégezhető:

1. lépés: Az egyes vizsgálati vegyi anyagokkal DMSO-dal vagy megfelelő oldószerrel hígítási sorozatot kell készíteni, és a három ismétléses elrendezésben kell elhelyezni a mikrotiterlemez lyukaiban az előkísérletben megállapított dózistartománynak megfelelő végső koncentrációsorozat szerint (egy tipikus oldatsorozat például az 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM és 10 pM (10^{-3}–10^{-11} M)).

2. lépés: Vegyi anyag hígítása: az oldószerben először 1,5 µl mennyiségű vizsgálati vegyi anyagot oldjunk fel a tápoldat 500 µl-jében.

3. lépés: A sejtek kezelése a vegyi anyaggal: a (2. lépésben elkészített) tápoldattal hígított 50 µl mennyiségű anyagot adjuk hozzá a lyukanként és 100 µl-enként 10^4 sejtet tartalmazó vizsgálati lyukakhoz.

Az egyes lyukakba helyezendő tápoldat végleges ajánlott térfogata 150 µl. A vizsgálati minták és a referenciaszabványok elosztása történhet a 3. és 4. táblázatban foglaltak szerint.

▼M8

3. táblázat

Példa az ösztrogénreceptor agonista vizsgálathoz használt vizsgálati lemezen tesztelt referenciaszabványok koncentrációértékeire

Sor	17α-metiltesztoszteron			Kortikoszteron			17α-ösztradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1. konc. (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	2. konc. (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	3. konc. (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	4. konc. (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	5. konc. (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	6. konc. (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	7. konc. (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vivőanyagos kontroll (0,1 % DMSO); PC: Pozitív kontroll (1 nM E2).

27. A referenciaszabványokat (E2, 17α-ösztradiol, 17α-metiltesztoszteron és kortikoszteron) minden vizsgálatmenetben tesztelni kell (3. táblázat)vvMinden vizsgálati lemezen legyenek pozitív kontrollként szolgáló, a maximális indukciót előidéző 1 nM mennyiségű E2-vel kezelt lyukak, és kizárólag DMSO-dal (vagy megfelelő oldószerrel) kezelt, vivőanyagos kontrollként szolgáló lyukak (4. táblázat). Amennyiben egy adott kísérlet során különböző forrásból származó (pl. eltérő passzálásból, más tételből származó stb.) sejteket alkalmaznak, a referenciaszabványokat minden egyes sejtforráshoz külön vizsgálni kell.

4. táblázat

Példa az ösztrogénreceptor agonista vizsgálathoz használt vizsgálati lemez elrendezésére a vizsgálati és kontrollanyagok különböző koncentrációjánál

Sor	1. vizsgálati vegyi anyag			2. vizsgálati vegyi anyag			3. vizsgálati vegyi anyag			4. vizsgálati vegyi anyag		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1. konc. (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	2. konc. (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	3. konc. (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→

▼**M8**

Sor	1. vizsgálati vegyi anyag			2. vizsgálati vegyi anyag			3. vizsgálati vegyi anyag			4. vizsgálati vegyi anyag		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	4. konc. (10 nM)	→	→	1 μM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	5. konc. (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	6. konc. (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	7. konc. (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vivőanyagos kontroll (0,1 % DMSO); PC: Pozitív kontroll (1 nM E2).

5. táblázat

Példa az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálathoz használt vizsgálati lemez elrendezésére a referenciaszabványok különböző koncentrációjánál

Sor	Tamoxifén			Flutamid			1. vizsgálati vegyi anyag			2. vizsgálati vegyi anyag		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1. konc. (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	2. konc. (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
C	3. konc. (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	4. konc. (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	5. konc. (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	6. konc. (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vivőanyagos kontroll (0,1 % DMSO), PC: Pozitív kontroll (1 nM E2), OHT: 4-hidroxitamoxifén, Dig: Digitonin.

= 25 pM E2-vel kiegészítve

28. A vegyi anyagok antagonista aktivitásának értékeléséhez az A–G sor vizsgálati lyukaihoz hozzá kell adni 25 pM E2-t. A referenciaszabványokat (tamoxifén és flutamid) minden vizsgálatmenetben tesztelni kell. Minden vizsgálati lemezen legyenek pozitív kontrollként szolgáló, a hERα-HeLa-9903 sejtvonal minőség-ellenőrzésére használható 1 nM E2-vel kezelt lyukak, DMSO-dal (vagy megfelelő oldószerrel) kezelt, vivőanyagos kontrollként szolgáló lyukak, 0,1 % DMSO-dal kezelt, „kiegészítő kontrollként” szolgáló lyukak, amelyek DMSO mellett E2-t is tartalmaznak, 1 μM végső koncentrációjú 4-hidroxitamoxifennel kezelt lyukak, valamint 100 μM digitonionnal kezelt lyukak (5. táblázat). A további vizsgálati lemezeken a referenciaszabványokat tartalmazó lyukak kivételével ugyanezt az elrendezést kell alkalmazni (6. táblázat). Amennyiben egy adott kísérlet során különböző forrásból származó (pl. eltérő passzálásból, más tételből származó stb.) sejteket alkalmaznak, a referenciaszabványokat minden egyes sejtforráshoz külön vizsgálni kell.

▼M8

6. táblázat

Példa az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálathoz használt vizsgálati lemez elrendezésére a vizsgálati és kontrollanyagok különböző koncentrációjánál

Sor	1. vizsgálati vegyi anyag			2. vizsgálati vegyi anyag			3. vizsgálati vegyi anyag			4. vizsgálati vegyi anyag		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1. konc. (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	2. konc. (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	3. konc. (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	4. konc. (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	5. konc. (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	6. konc. (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Vivőanyagos kontroll (0,1 % DMSO), PC: Pozitív kontroll (1 nM E2), OHT: 4-hidroxitamoxifén, Dig: Digitonin.

: 25 pM E2-vel kiegészítve.

29. Adott esetben meg kell bizonyosodni arról, hogy nem érvényesül perem-hatás, ha gyaníthatóan fennáll peremhatás, annak kiküszöbölése érdekében módosítani kell a lemez elrendezését. Például olyan elrendezés alkalmazható, amelyen a széleken lévő lyukak üresen maradnak.

30. A vegyi anyagok hozzáadását követően a vizsgálati lemezeket 5 %-os CO_2-tartalmú inkubátorba n 37° ±1° C-on 20–24 órán át inkubálni kell, hogy a riportergén termékei kifejeződjenek.

31. Rendkívül illékony vegyületek esetén egyedi szempontokat is figyelembe kell venni. Ilyenkor ugyanis a kontrollanyagot tartalmazó közeli lyukak álpozitív eredményt hozhatnak, amit a várt és az ismert kontrollértékek fényében kell értékelni. Abban a néhány esetben, amikor az illékonyság gondot okozhat, „zárófólia” használatával hatékonyan izolálhatók az egyes lyukak a vizsgálat során, ezért ilyen esetekben zárófólia alkalmazása ajánlott.

32. A vizsgálatok függetlenségének biztosítása érdekében az azonos vegyi anyaggal végzett végleges vizsgálatokat különböző napokon kell megismételni.

Luciferáz vizsgálat

33. A vizsgálathoz kereskedelmi forgalomban beszerezhető luciferáz vizsgálati reagens [pl. Steady-Glo® luciferáz vizsgálati rendszer (Promega, E2510 vagy ezekkel egyenértékű rendszer)] vagy standard luciferáz vizsgálati rendszer (pl. Promega, E1500 vagy ezekkel egyenértékű rendszer) is használható, amennyiben teljesülnek az elfogadhatósági kritériumok. A vizsgálati reagenseket a használt luminométer érzékenysége alapján kell kiválasztani. Standard luciferáz vizsgálati rendszer alkalmazása esetén a szubsztrátum hozzáadása előtt sejtkultúrát lizáló reagenst (pl. Promega, E1531 vagy ezekkel egyenértékű reagenst) kell használni. A luciferáz reagenst a gyártó utasításai szerint kell alkalmazni.

AZ ADATOK ELEMZÉSE

Ösztrogénreceptor agonista vizsgálat

34. Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálat esetében a pozitív kontrollhoz (1 nM E2) viszonyított, relatív transzkripciós aktivitás meghatározásához egy adott lemez lumineszcencia jelei az alábbi lépések végrehajtásával elemezhetők (ezzel egyenértékű más matematikai eljárások is elfogadhatók):

1. lépés Számítsuk ki a VC átlagértékét.

▼M8

2. lépés Az adatok normalizálásához a VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.

3. lépés Számítsuk ki a normalizált PC átlagértékét.

4. lépés Osszuk el a lemez egyes lyukainak normalizált értékét a PC normalizált átlagértékével (PC=100 %).

Az egyes lyukak végső értéke adja meg az adott lyuk PC-válaszhoz viszonyított, relatív transzkripciós aktivitását.

5. lépés Számítsuk ki a vizsgálati vegyi anyag egyes koncentrációcsoportjaira jellemző relatív transzkripciós aktivitás átlagértékét. A válasznak két vetülete van: az átlagos transzkripciós aktivitás (válasz) és az adott koncentráció, amelynél bekövetkezik a válasz (lásd a következő részt).

Az EC_{50}, PC_{50} és PC_{10} indukció szempontjai

35. Az EC_{50} meghatározásához teljes koncentráció-válasz görbére van szükség, ennek létrehozása azonban a vizsgált koncentrációtartomány korlátaiból fakadóan (például citotoxicitás vagy oldhatósági problémák miatt) nem mindig megvalósítható vagy nem mindig praktikus. Mivel azonban az EC_{50} és az indukció maximális szintje (ami a Hill-egyenlet felső értékének felel meg) lényeges információt hordozó paraméterek, lehetőség szerint bele kell foglalni őket a jelentésbe. Az EC_{50} és az indukció maximális szintjének meghatározásához megfelelő statisztikai szoftvert kell használni (ilyen például a Graphpad Prism statisztikai szoftver). Amennyiben a koncentráció-válasz adatokra alkalmazható a Hill-féle logisztikai egyenlet, az EC_{50} értékét az alábbi egyenlettel kell kiszámítani (7):

Y=görbe alja + (görbe teteje-alja) / (1+10 exp. ((log EC_{50} –X) × Hill-meredekség)), ahol:

az × a koncentráció logaritmusa; valamint

az Y a válasz, az Y a szigmoid görbe aljánál kezdődik és a tetejéig halad. A Hill-féle logisztikai egyenletben a görbe aljához rögzítik a nullpontot.

36. Az egyes vizsgálati vegyi anyagok tekintetében az alábbi adatokat kell biztosítani:

az RPC_{Max} értéket, amely valamely vizsgálati vegyi anyag által előidézett maximális szintű válasz, amelyet ugyanazon lemezen vizsgált 1 nM mennyiségű E2 által kiváltott válasz százalékában adnak meg, továbbá a PC_{Max} értéket (az RPC_{Max} választ kiváltó koncentráció); valamint

pozitív vegyi anyagok esetében azokat a koncentrációkat, amelyeknél PC_{10}, illetve adott esetben PC_{50} hatás figyelhető meg.

37. A PC_x értéket interpolációval lehet számítani az X-Y koordinátatengely 2 pontja között, az egyik pontnak közvetlenül a PC_x érték felett, a másiknak közvetlenül alatta kell elhelyezkednie. Amennyiben a közvetlenül a PC_x érték felett elhelyezkedő adatpont koordinátája (a,b), az alatta elhelyezkedő adatponté pedig (c,d), akkor a PC_x érték az alábbi egyenlet alapján határozható meg:

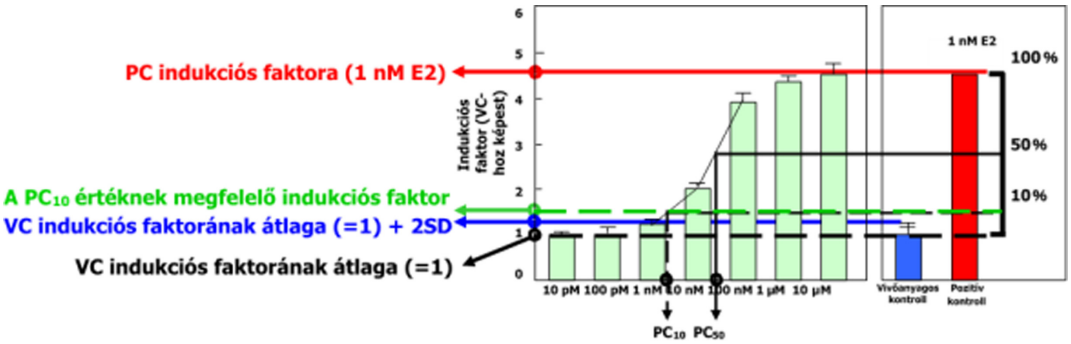
$\log[PC_x] = \log[c]+(x-d)/(d-b)$

▼M8

38. A PC-értékek leírását az alábbi 1. ábra ismerteti.

1. ábra

Példa a PC-értékek meghatározására. A PC (1 nM mennyiségű E2) minden vizsgálati lemezen megtalálható



Ösztrogénreceptor antagonista vizsgálat

39. Az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálat esetében a kiegészítő kontrollhoz (25 pM E2) viszonyított, relatív transzkripciós aktivitás meghatározásához egy adott lemez lumineszcencia jelei az alábbi lépések végrehajtásával elemezhetők (ezzel egyenértékű más matematikai eljárások is elfogadhatók):

1. lépés: Számítsuk ki a VC átlagértékét.

2. lépés: Az adatok normalizálásához a VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.

3. lépés: Számítsuk ki a normalizált kiegészítő kontroll átlagértékét.

4. lépés: Osszuk el a lemez egyes lyukainak normalizált értékét a normalizált kiegészítő kontroll átlagértékével (kiegészítő kontroll=100 %).

Az egyes lyukak végső értéke adja meg az adott lyuknak a kiegészítő kontroll válaszához viszonyított, relatív transzkripciós aktivitását.

5. lépés: Számítsuk ki az egyes kezelések során megfigyelt relatív transzkripciós aktivitás átlagértékét.

Az IC_{30} és IC_{50} indukció szempontjai

40. A pozitív vegyi anyagok esetében meg kell adni azokat a koncentrációkat, amelyeknél IC_{30}, illetve adott esetben IC_{50} hatás figyelhető meg.

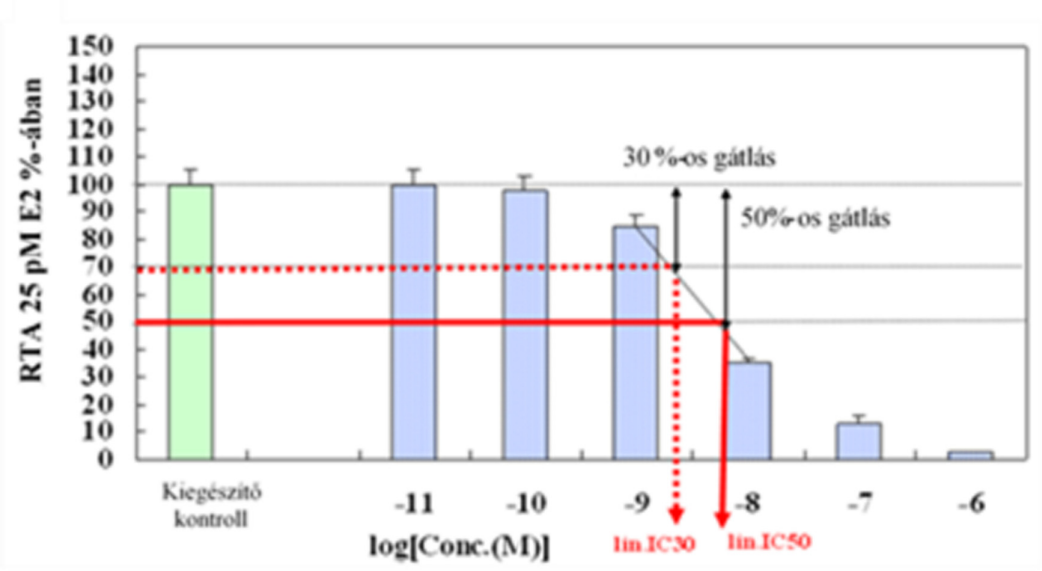
41. Az IC_x értéket interpolációval lehet kiszámítani az X-Y koordinátatengely 2 pontja között, az egyik pontnak közvetlenül az IC_x érték felett, a másiknak közvetlenül alatta kell elhelyezkednie. Amennyiben a közvetlenül az IC_x érték felett elhelyezkedő adatpont koordinátája (c,d), az alatta elhelyezkedő adatponté pedig (a,b), akkor az IC_x érték az alábbi egyenlet alapján határozható meg:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c)/(b-d)

▼M8

2. ábra

Példa az IC-értékek meghatározására A kiegészítő kontroll (25 pM E2) minden vizsgálati lemezen megtalálható



RTA: relatív transzkripciós aktivitás

42. Az eredményeknek két (vagy három) független vizsgálatmeneten kell alapulniuk. Amennyiben két vizsgálatmenet összevethető, vagyis reprodukálható eredményeket ad, akkor harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség. Az eredmények akkor elfogadhatók, ha:

— teljesülnek az elfogadhatósági kritériumok (e kritériumokat lásd a 14–20. pontban),

— megismételhetők.

Az adatok értelmezésének kritériumai

7. táblázat

Pozitív és negatív besorolás feltételei az ösztrogénreceptor agonista vizsgálatoknál

Pozitív	Amikor az RPC_{Max} érték két vagy három vizsgálatmenetből kettőben megegyezik a pozitív kontroll által előidézett válasz 10 %-ával, vagy meghaladja azt.
Negatív	Amikor az RPC_{Max} érték két vagy három vizsgálatmenetből kettőben nem éri el legalább a pozitív kontroll által előidézett válasz 10 %-át.

8. táblázat

Pozitív és negatív besorolás feltételei az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálatoknál

Pozitív	Amikor két vagy három vizsgálatmenetből kettőben számítható IC_{30} érték.
Negatív	Amikor két vagy három vizsgálatmenetből kettőben nem számítható IC_{30} érték.

▼M8

43. Az adatok értelmezésének kritériumait a 7. és a 8. táblázat tartalmazza. A pozitív eredményeket jellemezni kell mind a kiváltott hatás mértékével, mind a hatást előidéző koncentrációval. E két cél egyszerre teljesíthető azáltal, ha az eredményeket abban a koncentrációban fejezik ki, amelynél a PC-értékek 50 %-át (PC_{50}) vagy 10 %-át (PC_{10}) elérték az agonista vizsgálatban, és a kiegészítő kontroll értékének 50 %-a (IC_{50}) vagy 30 %-a (IC_{30}) gátlódott az antagonista vizsgálatban. Egy adott vizsgálati vegyi anyag pozitívnak minősül, ha a vizsgálati vegyi anyag által előidézett maximális válasz (RPC_{Max}) két vagy három vizsgálatmenetből kettőben megegyezik a pozitív kontroll által előidézett válasz 10 %-ával, vagy meghaladja azt, ugyanakkor negatívnak tekintendő, ha az RPC_{Max} értéke két vagy három vizsgálatmenetből kettőben nem éri el legalább a pozitív kontroll által előidézett válasz 10 %-át.

44. Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálat PC_{10}, PC_{50} és PC_{Max} értékeinek, valamint az ösztrogénreceptor antagonista vizsgálat IC_{30} és IC_{50} értékeinek kiszámításához igénybe lehet venni a vizsgálati iránymutatáshoz tartozó és az OECD nyilvános weboldalán ([1]) rendelkezésre álló táblázatot.

45. A PC_{10} vagy PC_{50} és az IC_{30} vagy IC^{50} értékek legalább két alkalommal történő meghatározása általában elegendőnek bizonyul. Ha azonban egy adott koncentrációtartományba tartozó adatoknál az alapvonal szórása elfogadhatatlanul magas variációs koefficiensű (CV; %), megkérdőjelezhető az adatok megbízhatósága, és be kell azonosítani a nagy szórás okát. A PC_{10} érték meghatározásához használt adatpontok nyers adatainak (vagyis a lumineszcencia intenzitására vonatkozó adatoknak) három ismétlésből számolt variációs koefficiense nem érheti el a 20 %-ot.

46. Az elfogadhatósági kritériumok teljesítése jelzi a vizsgálati rendszer megfelelő működését, de nem garantálja az egyes vizsgálatmenetek adatainak pontosságát. Az adatok pontosságát az biztosítja a legjobban, ha az első vizsgálatmenet eredményei megismételhetők.

47. Azon ösztrogénreceptor agonista vizsgálatok esetében, amelyeknél a pozitív vizsgálati vegyi anyagok – különösen a PC_{10}–PC_{49} értékkel rendelkező és a gyaníthatóan túlzott luciferáz-aktivitást okozó vegyi anyagok – tekintetében több információra van szükség, mint amit e szűrési és rangsorolási célú vizsgálati iránymutatás biztosít, egy ERα antagonista használatával megerősíthető, hogy a megfigyelt luciferáz-aktivitást kizárólag az ERα idézi elő (lásd a 2.1. függeléket).

VIZSGÁLATI JELENTÉS

48. Lásd „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” című 20. pontot.

SZAKIRODALOM

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

([1]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M8**

(4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

(5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769- 71.

(6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl.* Environ. Microbiol., 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. Physiol., 235, E97-El02.

▼M8

2.1. függelék

ÁLPOZITÍV EREDMÉNYEK: A NEM RECEPTOR ÁLTAL KÖZVETÍTETT LUMINESZCENCIA JELEK ÉRTÉKELÉSE

1. Az ösztrogénreceptor agonista vizsgálat álpozitív eredményei keletkezhetnek abból, hogy a luciferáz gént nem az ösztrogénreceptor által közvetített aktiválás indukálta, a géntermék közvetlenül aktiválódott, illetve a vizsgálattól független fluoreszcencia lépett fel. Az ilyen jellegű hatásokra a dózis-válasz görbe hiányosságából vagy szokatlan formájából lehet következtetni. Amennyiben gyaníthatóan ilyen hatások játszanak közre, meg kell vizsgálni egy ösztrogénreceptor antagonista (pl. nem toxikus koncentrációban alkalmazott 4-hidroxitamoxifén (OHT)) válaszra gyakorolt hatását. A tisztán antagonista ICI 1827 80 nem feltétlenül alkalmas erre a célra, mivel az ICI 1827 80 megfelelő koncentrációja csökkentheti a VC értékét, ami befolyásolja az adatelemzést.

2. E megközelítés hitelességének biztosítása érdekében az alábbiakat kell vizsgálni ugyanazon a lemezen:

   — az ismeretlen vegyi anyag agonista hatású aktivitása 10 μM OHT-vel és anélkül vizsgálva,

   — VC (három ismétlés),

   — OHT (három ismétlés),

   — agonista pozitív kontrollként 1 nM E2 (három ismétlés),

   — 1 nM E2 + OHT (három ismétlés).

Az adatok értelmezésének kritériumai

Megjegyzés: Valamennyi lyukat a vivőanyag azonos koncentrációjával kell kezelni.

— Amennyiben az ismeretlen vegyi anyag agonista hatású aktivitását NEM befolyásolja az ER-antagonistával való kezelése, akkor „negatívnak” minősítendő.

— Ha az ismeretlen vegyi anyag agonista hatású aktivitását teljesen gátolta a kezelés, akkor a döntési kritériumokat kell alkalmazni.

— Amennyiben a legalacsonyabb koncentrációnál az agonista hatású aktivitás megegyezik a PC_{10} válasszal vagy meghaladja azt, az ismeretlen vegyi anyag gátlása eléri vagy meghaladja a PC_{10} választ. Meg kell határozni a kezeletlen és az ER-antagonistával kezelt lyukak válaszreakciója közötti különbséget, és ez a különbség tekintendő valós válasznak, ez alapján kell kiszámítani a kategóriába sorolási döntést lehetővé tévő, megfelelő paramétereket.

Az adatok elemzése

Ellenőrizzük a teljesítményszabványokat.

Ellenőrizzük az azonos feltételekkel kezelt lyukak közötti variációs koefficienst.

1. Számítsuk ki a VC átlagát.

2. A VC átlagát vonjuk ki az egyes OHT-vel **nem** kezelt lyukaknál kapott értékből.

3. Számítsuk ki az OHT átlagát.

4. A VC átlagát vonjuk ki az egyes OHT-vel kezelt lyukaknál kapott értékből.

5. Számítsuk ki a PC átlagát.

6. Számítsuk ki a többi lyuk pozitív kontrollhoz viszonyított, relatív transzkripciós aktivitását.

▼M8

2.2. függelék

A DEXTRÁNBEVONATÚ AKTÍV SZÉNNEL (DCC) KEZELT SZÉRUM ELKÉSZÍTÉSE

1. A szérum dextránbevonatú aktív szénnel (DCC) történő kezelése egy általánosan használt módszer arra, hogy az ösztrogénhatású vegyületeket eltávolítsák a tápoldatot kiegészítő szérumból, biztosítva ezáltal, hogy a szérumban lévő maradék ösztrogének ne torzítsák el a válasz. Ezen eljárás keretében 500 ml magzati borjú szérumot (FBS) kezelnek.

Alkotóelemek

2. Az alábbi anyagokra és eszközökre lesz szükség:

Anyagok

Aktív szén

Dextrán

Magnézium-klorid-hexahidrát ($MgCl_2 \times 6H_2O$)

Szacharóz

1 M HEPES pufferoldat (pH-értéke 7,4)

Szűrőrendszerrel előállított ultra nagytisztaságú víz

Eszközök

Autokláv üvegedény (mérete szükség szerint módosítandó), általános laboratóriumi centrifuga (amely beállítható 4 °C-os hőmérsékletre)

Az eljárás

3. Az alábbi eljárást 50 ml-es centrifugacsövek használatához alakítottuk:

[1. nap] Készítsük el a dextránbevonatú aktív szén szuszpenziót, ehhez szükséges 1 l ultra nagytisztaságú víz, ami 1,5 mM $MgCl_2$-t, 0,25 M szacharózt, 2,5 g aktív szenet, 0,25 g dextránt és 5 mM HEPES puffert tartalmaz, majd 4 °C-on kevertessük egy éjszakán át.

[2. nap] Adagoljuk a szuszpenziót 50 ml-es centrifugacsövekbe, és 10 000 rpm sebességgel 4 °C-on centrifugáljuk 10 percig. Távolítsuk el a felülúszót, és az aktív szén üledék felét tároljuk 4 °C-on, ez a 3. napon kerül felhasználásra. Az aktív szén üledék másik felét szuszpendáljuk FBS-sel, amelyet előzőleg a kicsapódások elkerülése érdekében lassan felolvasztottunk és 56 °C-on 30 percig inaktiváltunk, majd helyezzük a szuszpenziót autoklávozott üvegedénybe, például Erlenmeyer-lombikba. Óvatosan kevertessük a szuszpenziót 4 °C-on egy éjszakán keresztül.

[3. nap] Adagoljuk az FBS-t tartalmazó szuszpenziót centrifugacsövekbe, és 10 000 rpm sebességgel 4 °C-on centrifugáljuk 10 percig. Gyűjtsük össze az FBS-t, és adjuk hozzá a második napon készített és eltárolt aktív szén üledéket. Szuszpendáljuk fel az aktív szén üledéket, majd a szuszpenziót egy autoklávozott üvegedényben óvatosan kevertessük 4 °C-on egy éjszakán keresztül.

[4. nap] Adagoljuk ki a szuszpenziót, és 10 000 rpm sebességgel 4 °C-on centrifugáljuk 10 percig, majd egy 0,2 μm steril szűrőn való átszűréssel sterilizáljuk a felülúszót. Ez a dextránbevonatú aktív szénnel kezelt magzati borjú szérum -20 °C-on tárolandó, és egy évig felhasználható.

▼M8

3. Függelék

ÖSZTROGÉNRECEPTOR AGONISTÁK ÉS ANTAGONISTÁK ÉSZLELÉSÉRE SZOLGÁLÓ VM7LUC ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

1. Ez a vizsgálat VM7Luc4E2 sejtvonalak ([1]) használatára épül. A vizsgálatot az Országos Toxikológiai Program Alternatív Toxikológiai Módszerek Értékelésével Foglalkozó Ügynökségközi Központja (NICEATM) és az alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottság (ICCVAM) validálta (1). A VM7Luc sejtvonalak elsősorban endogén ERα, kisebb mértékben endogén ERβ receptorokat fejeznek ki (2) (3) (4).

2. Ez a vizsgálat anyagok széles skálájára alkalmazható, feltéve, ha oldódnak dimetil-szulfoxidban (DMSO; CAS-szám: 67-68-5), nem lépnek reakcióba a DMSO-dal vagy a sejttenyésztő közeggel, és a vizsgált koncentrációkban nem citotoxikusak. Amennyiben DMSO nem használható, más vivőanyag, például etanol vagy víz is alkalmazható (lásd a 12. pontot). A VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs (ant)agonista vizsgálat bizonyított hatékonysága arra enged következtetni, hogy a vizsgálat során nyert adatok információt nyújthatnak az ER-közvetített hatásmechanizmusokról, és alkalmasak az anyagok további vizsgálatra való rangsorolására.

3. Ezt a vizsgálatot kifejezetten arra a célra tervezték, hogy a kémiai lumineszcencia mint végpont mérése révén észlelje a hERα és a hERß által közvetített transzaktivációt. A kémiai lumineszcenciát széles körben alkalmazzák a biológiai vizsgálatok során, mert a lumineszcencia nagy érzékenységgel mérhető a háttérzajhoz képest. A sejtalapú vizsgálatokban azonban a szentjánosbogár luciferáz aktivitását megzavarhatják olyan anyagok, amelyek gátlólag hatnak a luciferáz enzimre, és ezáltal egyaránt előidézhetnek látszólagos gátlást és fehérjestabilizációból fakadó erősebb lumineszcenciát. Emellett néhány luciferáz alapú ER riportergén vizsgálatban beszámoltak arról, hogy az 1 μM-nél magasabb fitoösztrogén-koncentrációnál a luciferáz riportergén túlzott aktiválása miatt nem receptorok által közvetített lumineszcencia jelek észlelhetők. Bár a dózis-válasz görbe arra utal, hogy az ER-rendszer ténylegesen alacsonyabb koncentrációknál aktiválódik, a magas fitoösztrogén-koncentráció mellett vagy feltehetőleg a luciferáz riportergént a fitoösztrogénhez hasonlóan túlzottan aktiváló vegyületek magas koncentrációja mellett kapott luciferáz-kifejeződést körültekintően kell vizsgálni a stabilan transzfektált ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálati rendszerekben.

4. E vizsgálat szabályozási célra való alkalmazása előtt el kell olvasni az „ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS” és „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részt. A vizsgálati módszerben használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

([1]) 2016 júniusa előtt ezt a sejtvonalat BG1Luc sejtvonalnak nevezték. A BG-1 sejteket eredetileg Greisinger és munkatársai (1998) írták le (12), később pedig a National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) kutatói karakterizálták (13). Nemrégiben rájöttek arra, hogy a kutatók a BG-1 sejtek két különböző variánsát, a BG-1 Fr-t és a BG-1 NIEHS-t használják. Li és munkatársai (2014) (14) a két BG-1 sejtvonalvariáns részletes elemzése, többek között DNS-vizsgálatuk elvégzése révén kimutatták, hogy a BG-1 Fr egyedi sejtvonal, és hogy a BG-1 NIEHS, vagyis a vizsgálat kidolgozásához eredetileg használt sejtvonal nem a BG1 humán petefészekrák sejtvonala, hanem az MCF7 humán mellráksejtvonal variánsa. A vizsgálatban alkalmazott sejtvonal, eredeti elnevezésén a BG1Luc4E2 (15), immár VM7Luc4E2 néven szerepel („V” = variáns; „M7” = MCF7 sejtek). Hasonlóképpen a vizsgálat jelenlegi elnevezése az VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktiváció. Bár ez módosítja a vizsgálat alapjául szolgáló sejtvonal eredetét, nem befolyásolja sem a közzétett validálási tanulmányokat, sem a vizsgálat hasznosságát és alkalmazhatóságát az ösztrogén/antiösztrogén hatású vegyi anyagok szűrésére.

▼M8

A VIZSGÁLAT ELVE (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

5. Ez a vizsgálat arra szolgál, hogy jelezze az ösztrogénreceptor ligandumhoz kötődését, amely ezt követően mint receptor-ligandum komplex transzlokálódik a sejtmagba. A receptor-ligandum komplex a sejtmagban a specifikus DNS válaszelemekhez kötődve transzaktiválja a riportergént (*luc*), aminek eredményeként luciferáz termelődik, majd fény szabadul fel, amelynek mennyisége luminométerrel meghatározható. A luciferáz-aktivitás számos kereskedelmi forgalomban kapható készlettel gyorsan és költséghatékonyan értékelhető. A VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktiváció során egy ösztrogénreceptor-reszponzív humán emlő adenokarcinoma sejtvonalat, a VM7-et használják, amelyet egy szentjánosbogár luciferáz riporterkonstrukcióval stabilan transzfektáltak, a riporter gén az egér emlőtumor vírus (MMTV) promóter előtt található négy ösztrogén válaszelem szabályzása alatt áll, így lehet észlelni *in vitro* az ösztrogénreceptor agonista vagy antagonista hatást kiváltó anyagokat. Ez az MMTV-promóter más szteroid és nem szteroid hormonokra csak csekély mértékben aktiválódik (8). Az adatok értelmezésének kritériumait részletesen a 41. pont ismerteti. Röviden: a pozitív válasz olyan koncentráció-válasz görbe alapján ismerhető fel, amely legalább három pontot tartalmaz, amelyeknek a szórása nem fed át (átlag ± SD), valamint a (normalizált relatív fényegységben [RLU] mért) válasz amplitúdója eléri a referenciaszabvány maximális értékének legalább 20 %-át (a referenciaszabvány a 17β-ösztradiol [E2; CAS-szám: 50-28-2] az agonista vizsgálat esetén, a raloxifen-hidroklorid [Ral; CAS-szám: 84 449-90-1]/E2 az antagonista vizsgálat esetén).

ELJÁRÁS

Sejtvonal

6. A vizsgálathoz stabilan transzfektált VM7Luc4E2 sejtvonalat kell használni. A sejtvonal jelenleg kizárólag szakmai licencszerződés birtokában szerezhető be a Kaliforniai Egyetemtől, Davis, Kalifornia, USA ([1]) és a Xenobiotic Detection Systems Inc. vállalattól, Durham, Észak-Karolina, USA ([2]).

A sejtvonal stabilitása

7. A sejtvonal stabilitásának és integritásának megőrzése érdekében a fagyasztott sejtkultúrából származó sejteket legalább két passzálásig megfelelő tápoldatban kell növeszteni (lásd a 9. pontot). A sejteket legfeljebb 30 alkalommal szabad passzálni. A VM7Luc4E2 sejtvonal esetében a 30 passzálás mintegy három hónapot vesz igénybe.

Sejttenyésztés és a leültetés körülményei

8. Az összes anyag és módszer minőségének biztosítása érdekében az Iránymutatás a megfelelő sejttenyésztési gyakorlathoz (5) (6) című dokumentumban meghatározott eljárások szerint kell eljárni, hogy garantálni lehessen az elvégzett tevékenységek integritását, hitelességét és megismételhetőségét.

9. A VM7Luc4E2 sejteket 0,9 % penicillinnel és sztreptomicinnel, valamint 8,0 % magzati borjú szérummal (FBS) kiegészített RPMI 1 640 tápoldatban tartják fenn, egy erre a célra alkalmas szövettenyésztő inkubátorban 37 °C-on (± 1 °C), 90 %-os (± 5 %) páratartalom és 5,0 %-os (± 1 %) CO_2-tartalom mellett.

10. Mintegy 80 %-os konfluencia elérését követően a VM7Luc4E2 sejteket szubkultúrákat hoznak létre és a leültetés előtt egy ösztrogénmentes környezetben 48 órán át kondicionálják, majd a sejteket leültetik egy 96 lyukú lemezre, ahol a vizsgálati vegyi anyaggal kezelik és elemzik a luciferáz-aktivitás ösztrogénfüggő indukcióját.

([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-cím: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

([2]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, e-mail-cím: info@dioxins.com, telefonszám: 919-688-4804, fax: 919-688-4404

▼M8

Az ösztrogénmentes tápoldat (EFM) egy fenolvörösmentes Dulbecco-féle módosított Eagle-tápoldat (DMEM), kiegészítve 4,5 % dextránbevonatú aktív szénnel kezelt magzati borjú szérummal (FBS), 1,9 % L-glutaminnal, valamint 0,9 % penicillinnel és sztreptomicinnel. A műanyag edényeken nem történhet ösztrogénhatású aktivitás [lásd a részletes protokollt (7)].

Elfogadhatósági kritériumok

11. Valamely vizsgálat elfogadására vagy elvetésére az egyes 96 lyukú lemezeken végzett kísérletekben alkalmazott referenciaszabványok és kontrollok eredményeinek értékelése alapján kerül sor. Minden referenciaszabványt több koncentrációban kell tesztelni, és minden referenciaszabvány- és kontrollanyag-koncentrációt több mintán kell vizsgálni. Az eredményeket össze kell vetni az e paraméterek minőség-ellenőrzésére szolgáló adatokkal, amelyek a laboratórium által a jártasság bizonyítása során létrehozott agonista és antagonista adatbázisokból származnak. Ezeket az adatbázisokat a referenciaszabványokra és a kontrollanyagokra kapott értékekkel folyamatosan frissítik. A felszerelés vagy a laboratóriumi körülmények változása esetén új adatbázisok létrehozására lehet szükség.

Agonista vizsgálat

Dózistartomány- kereső vizsgálat

- Indukció: A lemezen tapasztalt aktivitás indukciós faktorának méréséhez el kell osztani az E2 referenciaszabvány átlagos legmagasabb relatív fényegységét (RLU) a DMSO-kontroll átlagos RLU-értékével. Általában ötszörös indukció figyelhető meg, de a legalább négyszeres indukció már elfogadható.

- DMSO-kontroll eredményei: Az oldószeres kontroll RLU-értékeinek nem szabad meghaladniuk a dokumentált oldószeres kontrollok átlagos RLU-értékére jellemző standard deviáció 2,5-szeresét.

- Azt a kísérletet, amelyben e két elfogadhatósági kritérium bármelyike nem teljesül, figyelmen kívül kell hagyni és meg kell ismételni.

Teljes körű vizsgálat

Az agonista dózistartomány-kereső vizsgálat elfogadhatósági kritériumai mellett az alábbiakat foglalja magában:

- Referenciaszabvány eredményei: Az E2 referenciaszabvány koncentráció-válasz görbéje legyen szigmoid formájú és tartalmazzon legalább három értéket a koncentráció-válasz görbe lineáris szakaszán.

- Pozitív kontroll eredményei: A metoxiklórral végzett kontroll RLU-értékei haladják meg a DMSO átlagától való standard deviáció háromszorosával növelt DMSO-átlagot.

- Azt a kísérletet, amelyben valamely elfogadhatósági kritérium nem teljesül, figyelmen kívül kell hagyni és meg kell ismételni.

Antagonista vizsgálat

Dózistartomány- kereső vizsgálat

- Aktivitás csökkenése: A lemezen tapasztalt aktivitás csökkenésének méréséhez el kell osztani a Ral/E2 referenciaszabvány átlagos legmagasabb RLU-értékét a DMSO-kontroll átlagos RLU-értékével. Általában ötszörös csökkenés figyelhető meg, de a legalább háromszoros csökkenés már elfogadható.

- E2-kontroll eredményei: Az E2-kontroll RLU-értékeinek nem szabad meghaladniuk a dokumentált E2-kontrollok átlagos RLU-értékére jellemző standard deviáció 2,5-szeresét.

▼M8

- DMSO-kontroll eredményei: A DMSO-kontroll RLU-értékeinek nem szabad meghaladniuk a dokumentált oldószeres kontrollok átlagos RLU-értékére jellemző standard deviáció 2,5-szeresét.

- Azt a kísérletet, amelyben valamely elfogadhatósági kritérium nem teljesül, figyelmen kívül hagyják és megismétlik.

Teljes körű vizsgálat

Az antagonista dózistartomány-kereső vizsgálat elfogadhatósági kritériumai mellett az alábbiakat foglalja magában:

- Referenciaszabvány eredményei: A Ral/E2 referenciaszabvány koncentráció-válasz görbéje legyen szigmoid formájú és tartalmazzon legalább három értéket a koncentráció-válasz görbe lineáris szakaszán.

- Pozitív kontroll eredményei: A tamoxifénnel/E2-vel végzett kontroll RLU-értékei nem haladhatják meg az E2-kontroll átlagától való standard deviáció háromszorosával csökkentett E2-átlagot.

- Azt a kísérletet, amelyben valamely elfogadhatósági kritérium nem teljesül, figyelmen kívül hagyják és megismétlik.

Referenciaszabványok, pozitív és vivőanyagos kontrollok

Vivőanyagos kontroll (agonista és antagonista vizsgálat)

12. A vizsgálati vegyi anyagok feloldására használt vivőanyagot vivőanyagos kontroll keretében vizsgálni kell. A VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálása során használt vivőanyag 1 térfogatszázaléknyi dimetil-szulfoxid (DMSO, CAS-szám: 67-68-5) (lásd a 24. pontot). DMSO-tól eltérő vivőanyag használata esetén valamennyi referenciaszabványt, kontrollanyagot és vizsgálati vegyi anyagot ugyanabban a vivőanyagban kell tesztelni, ha alkalmazandó.

Referenciaszabvány (agonista dózisbehatárolás)

13. A referenciaszabvány az E2 (CAS-szám: 50-28-2). A dózistartomány-kereső vizsgálatban a referenciaszabvány az E2 négy elemből álló koncentrációsorozata (1,84 x 10^{-10}, 4,59 x 10^{-11}, 1,15 x 10^{-11} és 2,87 x 10^{-12} M), minden egyes koncentrációértéket replikátumban kell vizsgálni.

Referenciaszabvány (agonista teljes körű vizsgálat)

14. A teljes körű vizsgálatban az E2 1:2 arányban hígított 11 elemes (3,67 x 10^{-10} és 3,59 x 10^{-13} M között terjedő) koncentrációsorozatból áll, a koncentrációértékeket replikátumban vizsgálják.

Referenciaszabvány (antagonista dózisbehatárolás)

15. A referenciaszabvány a Ral (CAS-szám: 84 449-90-1) és az E2 (CAS-szám: 50-28-2) kombinációja. A dózistartomány-kereső vizsgálatban a Ral/E2 a Ral három elemből álló hígított koncentrációsorozatából (3,06 x 10^{-9}, 7,67 x 10^{-10} és 1,92 x 10^{-10} M) és az E2 fix koncentrációjából (9,18 × 10^{-11} M) tevődik össze, minden koncentrációértéket replikátumban vizsgálnak.

Referenciaszabvány (antagonista teljes körű vizsgálat)

16. A teljes körű vizsgálatban a Ral/E2 a Ral 1:2 arányban hígított (2,45 x 10^{-8} és 9,57 x 10^{-11} M között terjedő) koncentrációsorozatából és az E2 fix koncentrációjából (9,18 × 10^{-11} M) tevődik össze, a Ral/E2 kilenc koncentrációértékének mindegyikét replikátumban vizsgálják.

Gyenge pozitív kontroll (agonista)

17. A gyenge pozitív kontroll az ösztrogénmentes közegben vizsgált 9,06 x 10^{-6} M *p,p'*-metoxiklór (metoxiklór; CAS-száma: 72-43-5).

▼M8

Gyenge pozitív kontroll (antagonista)

18. A gyenge pozitív kontroll az ösztrogénmentes közegben, 9,18 × 10^{-11} M E2 jelenlétében vizsgált 3,36 x 10^{-6} M tamoxifén (CAS-száma: 10 540-29-1).

E2-kontroll (csak antagonista vizsgálat esetén)

19. Az alapvonal negatív kontrollként szolgáló E2-kontroll az ösztrogénmentes közegben vizsgált 9,18 × 10^{-11} M E2.

Indukciós faktor (agonista)

20. A referenciaszabvány (E2) által előidézett luciferáz-aktivitás méréséhez el kell osztani az E2 referenciaszabvány átlagos legmagasabb RLU-értékét a DMSO-kontroll átlagos RLU-értékével; az eredménynek négyszeresnél nagyobb indukciót kell jeleznie.

Indukciós faktor (antagonista)

21. A referenciaszabvány (Ral/E2) által előidézett átlagos luciferáz-aktivitás méréséhez el kell osztani a Ral/E2 referenciaszabvány átlagos legmagasabb RLU-értékét a DMSO-kontroll átlagos RLU-értékével, és az eredménynek háromszorosnál nagyobb csökkenést kell mutatnia.

A laboratórium jártasságának igazolása (lásd a vizsgálati módszer „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részének 14. pontját, valamint 3. és 4. táblázatát).

Vivőanyag

22. A vizsgálati vegyi anyagokat olyan oldószerben kell feloldani, amelyik szolubilizálja a vizsgálati vegyi anyagot és elegyedik a tápoldattal. A megfelelő vivőanyagok közé tartozik a víz, az etanol (95–100 %-os tisztaságban) és a dimetil-szulfoxid. Dimetil-szulfoxid használata esetén az anyag mennyisége nem haladhatja meg az 1 térfogatszázalékot. Minden vivőanyag esetében igazolni kell, hogy maximális alkalmazott térfogatuk nem fejt ki citotoxikus hatást és nem zavarja a vizsgálat teljesítményét. A referenciaszabványokat és kontrollanyagokat 100 %-os oldószerben feloldják, majd ösztrogénmentes közegben a megfelelő koncentrációkra hígítják.

Vizsgálati vegyi anyagok előkészítése

23. A vizsgálati vegyi anyagokat 100 %-os DMSO-ban (vagy megfelelő oldószerben) feloldják, majd ösztrogénmentes közegben a megfelelő koncentrációkra hígítják. Feloldás és hígítás előtt meg kell várni, hogy minden vizsgálati vegyi anyag szobahőmérsékletű legyen. A vizsgálati vegyi anyag oldatait minden kísérlethez frissen kell elkészíteni. Az oldatban nem lehet szemmel látható kicsapódás és az oldat nem lehet zavaros. A referenciaszabványok és kontrollanyagok nagy tételben is előkészíthetők; a referenciaszabványok és kontrollanyagok végleges oldatait, valamint a vizsgálati vegyi anyagokat minden egyes kísérlethez frissen kell készíteni, és az elkészítéstől számított 24 órán belül fel kell használni.

Oldhatóság és citotoxicitás: a dózisbehatárolás szempontjai

24. A dózistartomány-kereső vizsgálat hét koncentrációban és duplikátumban vizsgált 1: 10 arányú oldatsorozatból áll. A vizsgálati vegyi anyagokat először a legmagasabb koncentrációig vizsgálják, ami az agonista vizsgálat esetében 1 mg/ml (~1 mM), az antagonista vizsgálat esetében pedig 20 μg/ml (~10 μM). A dózistartomány-kereső kísérletek az alábbiak meghatározására szolgálnak:

— a vizsgálati vegyi anyag teljes körű vizsgálat során alkalmazandó induló koncentrációértékei;

— a vizsgálati vegyi anyag teljes körű vizsgálat során alkalmazandó (1:2 vagy 1:5 arányú) hígításai.

▼M8

25. Az agonista és antagonista vizsgálati protokollokba belefoglalták a sejtéletképesség/citotoxicitás mérését (7), ami részét képezi mind a dózistartomány-kereső, mind a teljes körű vizsgálatnak. A VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálása során (1) a sejtéletképesség megállapítása céljából egy lépcsőzetes kvalitatív vizuális megfigyelési módszerrel mérték fel a citotoxicitást; a citotoxicitás meghatározásához azonban kvantitatív módszert is lehet alkalmazni (lásd a protokollt (7)). Az életképességet több mint 20 %-kal csökkentő vegyianyag-koncentrációkra vonatkozó adatok nem használhatók.

Vegyi anyaggal történő kezelés és a vizsgálati lemez elrendezése

26. A sejteket megszámlálják és ösztrogénmentes tápoldatban (lyukanként 2 x 10^5 sejt sűrűségben) 96 lyukú szövettenyésztő lemezre szélesztik ki, majd 24 órán át inkubálják, hogy a sejtek kitapadjanak a lemezre. Ezt követően az ösztrogénmentes tápoldatot eltávolítják, és a sejteket ösztrogénmentes tápoldatba adagolt vizsgálati és referencia vegyi anyagokkal 19–24 órán keresztül inkubálják. Rendkívül illékony anyagok esetén egyedi szempontokat is figyelembe kell venni, mivel a kontrollanyagot tartalmazó közeli lyukak álpozitív eredményhez vezethetnek. Ilyen esetekben a „zárófólia” használata hatékonyan izolálhatja az egyes lyukakat a vizsgálat során, ezért alkalmazása ajánlott.

Dózistartomány-kereső vizsgálatok

27. A dózistartomány-kereső vizsgálat során a 96 lyukú lemez összes lyukának felhasználásával akár hat vizsgálati vegyi anyag is tesztelhető hét koncentrációban, duplikátumban, 1:10 arányú hígítási sorozatban (lásd az 1. és a 2. ábrát).

— Az *agonista* dózistartomány-kereső vizsgálat során referenciaszabványként az E2 négy koncentrációját mérik duplikátumban, és négy lyukat tartanak fent a DMSO-kontroll számára.

— Az *antagonista* dózistartomány-kereső vizsgálat során pedig referenciaszabványként a Ral/E2 három koncentrációját mérik 9,18 × 10^{-11} M E2-vel duplikátumban, és három-három lyukat tartanak fent az E2 és a DMSO-kontroll számára.

1. ábra

A 96 lyukú lemez elrendezése agonista dózistartomány-kereső vizsgálathoz

	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

Rövidítések: E2-1 és E2-4 között = az E2 referenciaszabvány koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC1-1 és TC1-7 között = az 1. vizsgálati vegyi anyag (TC1) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC2-1 és TC2-7 között = a 2. vizsgálati vegyi anyag (TC2) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC3-1 és TC3-7 között = a 3. vizsgálati vegyi anyag (TC3) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC4-1 és TC4-7 között = a 4. vizsgálati vegyi anyag (TC4) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC5-1 és TC5-7 között = az 5. vizsgálati vegyi anyag (TC5) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC6-1 és TC6-7 között = a 6. vizsgálati vegyi anyag (TC6) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); VC = vivőanyagos kontroll (DMSO [1 térfogatszázalék EFM-ben]).

▼M8

2. ábra

A 96 lyukú lemez elrendezése antagonista dózistartomány-kereső vizsgálathoz

	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

Rövidítések: E2 = E2-kontroll; Ral-1 és Ral-3 között = a raloxifen/E2 referenciaszabvány koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC1-1 és TC1-7 között = az 1. vizsgálati vegyi anyag (TC1) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC2-1 és TC2-7 között = a 2. vizsgálati vegyi anyag (TC2) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC3-1 és TC3-7 között = a 3. vizsgálati vegyi anyag (TC3) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC4-1 és TC4-7 között = a 4. vizsgálati vegyi anyag (TC4) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC5-1 és TC5-7 között = az 5. vizsgálati vegyi anyag (TC5) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC6-1 és TC6-7 között = a 6. vizsgálati vegyi anyag (TC6) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); VC = vivőanyagos kontroll (DMSO [1 térfogatszázalék EFM-ben]).

Megjegyzés: Minden vizsgálati vegyi anyagot $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 jelenlétében kell vizsgálni.

28. Az egyes lyukakba helyezendő tápoldat végleges ajánlott térfogata 200 µl. Csak olyan vizsgálati lemezek használhatók, amelyek valamennyi lyukában a sejtek életképessége legalább 80 %.

29. A teljes körű ***agonista*** vizsgálat induló koncentrációértékeinek meghatározását részletesen ismerteti az agonista protokoll (7). Röviden az alábbi kritériumoknak kell megfelelni:

— Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag koncentrációgörbéjén nincs olyan pont, amelyik meghaladná a DMSO-kontroll átlagától való standard deviáció háromszorosával növelt átlagot, a teljes körű vizsgálatot 1:2 arányban hígított, 11 elemből álló koncentrációsorozattal kell végrehajtani, a maximális oldható koncentrációval kezdve.

— Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag koncentrációgörbéjén vannak olyan pontok, amelyek meghaladják a DMSO-kontroll átlagától való standard deviáció háromszorosával növelt átlagot, a teljes körű vizsgálat 11 koncentrációjú hígítási rendszerének induló koncentrációértéke egy loggal magasabb legyen annál a koncentrációnál, amely a dózisbehatárolás során a legmagasabb kiigazított RLU-értéket adta. A 11 koncentrációjú hígítási rendszer alapja az 1:2 vagy 1:5 arányú hígítás, az alábbi kritériumok alapján:

Az 1:2 arányban hígított, 11 elemből álló koncentrációsorozat akkor alkalmazandó, ha az eredményül kapott koncentrációtartomány – a dózistartomány-kereső vizsgálat koncentráció-válasz görbéje alapján – magában foglalja a válaszok teljes tartományát. Ellenkező esetben 1:5 arányú hígítást kell alkalmazni.

▼M8

— Amennyiben valamely vizsgálati vegyi anyag dózistartomány-kereső vizsgálata kétfázisú koncentráció-válasz görbét eredményez, a teljes körű vizsgálat során mindkét fázist figyelembe kell venni.

30. A teljes körű ***antagonista*** vizsgálat induló koncentrációértékeinek meghatározását részletesen ismerteti az antagonista protokoll (7). Röviden az alábbi kritériumoknak kell megfelelni:

— Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag koncentrációgörbéjén nincs olyan pont, ami kisebb mint az E2-kontroll átlagától való standard deviáció háromszorosával csökkentett átlag, a teljes körű vizsgálatot 1:2 arányban hígított, 11 elemből álló koncentrációsorozattal kell végrehajtani, a maximális oldható koncentrációval kezdve.

— Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag koncentrációgörbéjén vannak olyan pontok, amelyek nem haladják meg az E2-kontroll átlagától való standard deviáció háromszorosával csökkentett átlagot, a teljes körű vizsgálat 11 koncentrációjú hígítási rendszerének induló koncentrációértéke az alábbiak egyike kell legyen:

• a dózisbehatárolás során a legalacsonyabb kiigazított RLU-értéket adó koncentráció;

• a maximális oldható koncentráció (lásd az antagonista protokoll (7) 14-2. ábráját);

• a legalacsonyabb citotoxikus koncentráció (vonatkozó példához lásd az antagonista protokoll (7) 14-3. ábráját).

— A 11 koncentrációjú hígítási rendszer alapja az 1:2 vagy 1: 5 arányú hígítás, az alábbi kritériumok alapján:

Az 1:2 arányban hígított, 11 elemből álló koncentrációsorozat akkor alkalmazandó, ha az eredményül kapott koncentrációtartomány – a dózistartomány-kereső vizsgálat koncentráció-válasz görbéje alapján – magában foglalja a válaszok teljes tartományát. Ellenkező esetben 1:5 arányú hígítást kell alkalmazni.

Teljes körű tesztelés

31. A teljes körű vizsgálat egy 11 elemes koncentrációsorozatból áll (1:2 vagy 1:5 arányú hígítás alkalmazandó a teljes körű vizsgálat induló koncentrációértékének meghatározási kritériumai alapján), és minden koncentrációértéket három ismétlésben mérnek egy 96 lyukú lemezen (lásd a 3. és 4. ábrát).

— Az *agonista* teljes körű vizsgálat során referenciaszabványként az E2 11 koncentrációját mérik replikátumban. Mindegyik lemezen négy replikátum lyukat tartanak fent a DMSO-kontroll és négy replikátum lyukat a metoxiklórral végzett kontroll ($9{,}06 \times 10^{-6}$ M) számára.

— Az *antagonista* teljes körű vizsgálat során referenciaszabványként a Ral/E2 kilenc koncentrációját mérik $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2-vel duplikátumban, emellett négy replikátum lyukat tartanak fent a $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2-kontroll, négy replikátum lyukat a DMSO-kontroll és négy replikátum lyukat a $3{,}36 \times 10^{-6}$ M tamoxifén kontroll számára.

▼M8

3. ábra

A 96 lyukú lemez elrendezése agonista teljes körű vizsgálathoz

	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	Met
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met

Rövidítések: TC1-1 és TC1-11 között = a 1. vizsgálati vegyi anyag koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC2-1 és TC2-11 között = a 2. vizsgálati vegyi anyag koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); E2-1 és E2-11 között = az E2 referenciaszabvány koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); Met = p,p'-metoxiklórral végzett gyenge pozitív kontroll; VC = 1 térfogatszázalék DMSO-dal EFM-ben végzett vivőanyagos kontroll.

4. ábra

A 96 lyukú lemez elrendezése antagonista teljes körű vizsgálathoz

	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

Rövidítések: E2 = E2-kontroll; Ral-1 és Ral-9 között = a raloxifen/E2 referenciaszabvány koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); Tam = tamoxifénnel/E2-vel végzett gyenge pozitív kontroll; TC1-1 és TC1-11 között = az 1. vizsgálati vegyi anyag (TC1) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); TC2-1 és TC2-11 között = a 2. vizsgálati vegyi anyag (TC2) koncentrációi (magastól az alacsony felé haladva); VC = vivőanyagos kontroll (DMSO [1 térfogatszázalék EFM-ben]).

Megjegyzés: Amint az már említésre került, minden referencia és vizsgálati anyagot tartalmazó lyuk fix koncentrációban (9,18 x 10^{-11} M) E2-t tartalmaz.

32. A vizsgálatok függetlenségének biztosítása érdekében az azonos vegyi anyaggal végzett teljes körű vizsgálatokat különböző napokon kell megismételni. Legalább két teljes körű vizsgálatot kell végezni. Ha az egyik vizsgálat eredménye ellentmond a másikénak (pl. az egyik pozitív, a másik negatív), vagy ha az egyik vizsgálat nem megfelelő eredményre vezetett, egy további, harmadik vizsgálatra van szükség.

A lumineszcencia mérése

33. A lumineszcencia 300 és 650 nm közötti tartományban mérhető, a mérés egy injektor luminométer és egy szoftver segítségével történik, ez utóbbi szabályozza az injektált térfogatot és a mérési időközt (7). Az egyes lyukak által kibocsátott fényt lyukankénti RLU-ban fejezik ki.

▼**M8**

AZ ADATOK ELEMZÉSE

Az EC_{50} /IC_{50} érték meghatározása

34. Az EC_{50} érték (a vizsgálati vegyi anyag maximális hatásának felét kiváltó koncentráció [agonisták esetében]) és az IC_{50} érték (a vizsgálati vegyi anyag maximális gátló hatásának felét kiváltó koncentráció [antagonisták esetében]) a koncentráció-válasz adatok alapján kerül meghatározásra. A legalább egy koncentrációban pozitívnak bizonyult vizsgálati vegyi anyagoknál a vizsgálati vegyi anyag félmaximális választ kiváltó koncentrációját (IC_{50} vagy EC_{50}) Hill-féle funkcióanalízissel vagy annak megfelelő alternatívájával számítják ki. A Hill-féle funkcióanalízis egy négy paraméteres logisztikai-matematikai modell, amely az alábbi egyenlet révén összekapcsolja a vizsgálati vegyi anyag koncentrációját a válasszal (ami általában egy szigmoid görbe formáját veszi fel): *Y = Görbe alja + (Görbe teteje - Görbe alja)* $1 + 10(lgC_{50} - x)$*Hill-meredekség*

$$Y = Görbe\ alja + \frac{(Görbe\ teteje - Görbe\ alja)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)Hill - meredekség}$$

ahol:

Y = a válasz (vagyis az RLU-értékek);

X = a koncentráció logaritmusa;

Görbe alja = a minimális válasz;

Görbe teteje = a maximális válasz;

lg EC_{50} (vagy lg IC_{50}) = az X logaritmusa, a görbe teteje és alja közötti válasz;

Hill-meredekség = a görbe meredeksége.

A modell kikalkulálja a felső, alsó, meredekségi, IC_{50} és EC_{50} paraméterek legjobb mérőszámait. Az EC_{50} és IC_{50} értékek meghatározásához megfelelő statisztikai szoftvert kell használni (ilyen például a Graphpad Prism^{R} statisztikai szoftver).

Kiugró értékek meghatározása

35. A statisztikai eredmények megfelelő értékelését megkönnyíti, ha a vizsgálat során (egyebek mellett) elvégeznek egy Q-tesztet (az adatelemzésből kizárandó „használhatatlan” lyukak azonosításáról lásd az agonista és antagonista protokollt (7)).

36. Az E2 referenciaszabvány (két mintájú) replikátumai esetében az E2 bármely koncentrációjú replikátumának kiigazított RLU-értéke akkor tekinthető kiugrónak, ha az adott érték 20 %-kal alatta vagy felette van az adatbázisban az adott koncentrációra vonatkozó kiigazított RLU-értéknek.

Luminométerrel mért adatok begyűjtése és kiigazítása dózistartomány-kereső vizsgálathoz

37. A luminométer által szolgáltatott nyers adatokat át kell vezetni a vizsgálat céljára létrehozott táblázatsablonba. Meg kell határozni, hogy vannak-e a vizsgálatból kizárandó kiugró adatok. (Lásd az elemzés során meghatározott paraméterekre vonatkozó elfogadhatósági kritériumokat.) Az alábbi számításokat kell elvégezni:

Agonista vizsgálat

1. lépés Számítsuk ki a DMSO vivőanyagos kontroll (VC) átlagértékét.

2. lépés Az adatok normalizálásához a DMSO VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.

▼**M8**

3. lépés Számítsuk ki a referenciaszabvány (E2) átlagos indukciós faktorát.

4. lépés Számítsuk ki a vizsgálati vegyi anyagok átlagos EC_{50} értékét.

Antagonista vizsgálat

1. lépés Számítsuk ki a DMSO VC átlagértékét.

2. lépés Az adatok normalizálásához a DMSO VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.

3. lépés Számítsuk ki a referenciaszabvány (Ral/E2) átlagos redukciós faktorát.

4. lépés Számítsuk ki az E2 referenciaszabvány átlagértékét.

5. lépés Számítsuk ki a vizsgálati vegyi anyagok átlagos IC_{50} értékét.

A teljes körű vizsgálat során a luminométerrel mért adatok begyűjtése és kiigazítása

38. A luminométer által szolgáltatott nyers adatokat át kell vezetni a vizsgálat céljára létrehozott táblázatsablonba. Meg kell határozni, hogy vannak-e a vizsgálatból kizárandó kiugró adatok. (Lásd az elemzés során meghatározott paraméterekre vonatkozó elfogadhatósági kritériumokat.) Az alábbi számításokat végzik el:

Agonista vizsgálat

1. lépés Számítsuk ki a DMSO VC átlagértékét.

2. lépés Az adatok normalizálásához a DMSO VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.

3. lépés Számítsuk ki a referenciaszabvány (E2) átlagos indukciós faktorát.

4. lépés Számítsuk ki az E2 és a vizsgálati vegyi anyagok átlagos EC_{50} értékét.

5. lépés Számítsuk ki a metoxiklór átlagos kiigazított RLU-értékét.

Antagonista vizsgálat

1. lépés Számítsuk ki a DMSO VC átlagértékét.

2. lépés Az adatok normalizálásához a DMSO VC átlagértékét vonjuk ki az egyes lyukaknál kapott értékből.

3. lépés Számítsuk ki a referenciaszabvány (Ral/E2) átlagos indukciós faktorát.

4. lépés Számítsuk ki a Ral/E2 és a vizsgálati vegyi anyagok átlagos IC_{50} értékét.

5. lépés Számítsuk ki a tamoxifén átlagos kiigazított RLU-értékét.

6. lépés Számítsuk ki az E2 referenciaszabvány átlagértékét.

▼M8

Az adatok értelmezésének kritériumai

39. A VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat célja, hogy egy bizonyítékok súlyozásán (WoE) alapuló megközelítés részeként segítsen rangsorolni az anyagokat az endokrin zavarokat mérő *in vivo* vizsgálatokhoz. E rangsorolási folyamat egyik lépése az, amikor a vizsgálati vegyi anyagokat ösztrogénreceptor agonista vagy ösztrogénreceptor antagonista aktivitás szempontjából pozitívként vagy negatívként azonosítják. Az 1. táblázat ismerteti azokat a döntési kritériumokat, amelyek alapján a VM7Luc ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálat validálási tanulmánya során pozitívnak vagy negatívnak minősítették az anyagokat.

1. táblázat

Pozitív és negatív döntési kritériumok

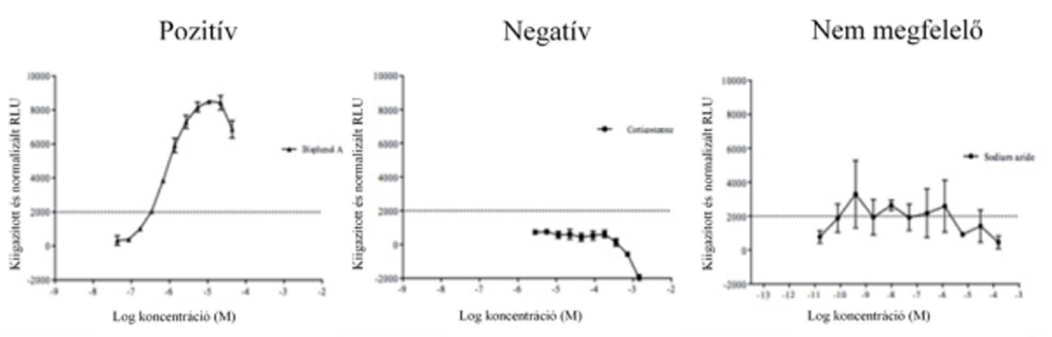
AGONISTA AKTIVITÁS	
Pozitív	— Az ösztrogénreceptor agonista aktivitás szempontjából *pozitívnak* minősített minden vizsgálati vegyi anyag koncentráció-válasz görbéjén lennie kell egy alapvonalnak, amelyet egy pozitív meredekség követ, amely egy platóban vagy csúcspontban zárul. Bizonyos esetekben e három jellemző közül csak kettő határozható meg (alapvonal-meredekség vagy meredekség-csúcspont). — A pozitív meredekséget meghatározó vonalnak legalább három olyan pontot kell tartalmaznia, amelyeknek a szórása nem fed át (átlag ± SD). Az alapvonalat alkotó pontok nem számítanak, de a görbe lineáris szakasza tartalmazhatja a csúcspontot vagy a plató első pontját. — A pozitív besoroláshoz szükséges továbbá, hogy a válasz amplitúdója (vagyis az alapvonal és a csúcspont közötti különbség) elérje legalább az E2 referenciaszabvány maximális értékének 20 %-át (vagyis legalább 2 000 RLU-t, amikor az [E2] referenciaszabvány kiigazított maximális válaszértéke 10 000 RLU). — Amennyiben megoldható, meg kell határozni minden pozitív vizsgálati vegyi anyag EC_{50} értékét.
Negatív	Egy adott koncentráció átlagos kiigazított RLU-értéke megegyezik azzal az értékkel, vagy alatta marad annak az értéknek, amely a DMSO-kontroll átlagos RLU-értéke plusz a DMSO RLU-értékétől való standard deviáció háromszorosa.
Nem megfelelő	Azok az adatok nem tekinthetők hitelesnek, amelyek jelentős kvalitatív vagy kvantitatív korlátok miatt az aktivitás meglétét vagy hiányát mutatják, és ezért nem megfelelőnek kell minősíteni azokat, és nem használhatók fel a vizsgálati vegyi anyag pozitívként vagy negatívként való besorolásához. Ilyenkor a vegyi anyagokat újbóli vizsgálatnak kell alávetni.
ANTAGONISTA AKTIVITÁS	
Pozitív	— A vizsgálati anyag adatai olyan koncentráció-válasz görbét rajzolnak ki, amelyik egy platóból induló negatív meredekség követ. — A negatív meredekséget meghatározó vonal legalább három pontot tartalmaz egymást nem fedő hibasávokkal; az alapvonalat alkotó pontok nem számítanak, de a görbe lineáris szakasza tartalmazhatja a plató első pontját. — A Ral/E2 referenciaszabvány maximális értékéhez képest legalább 20 %-ot kell csökkennie az aktivitásnak (vagyis legfeljebb 8 000 RLU lehet, amikor a [Ral/E2] referenciaszabvány kiigazított maximális válaszértéke 10 000 RLU). — A vizsgálati vegyi anyag legmagasabb nem toxikus koncentrációja legfeljebb 1×10^{-5} M lehet. — Amennyiben megoldható, meg kell határozni minden pozitív vizsgálati vegyi anyag IC_{50} értékét.
Negatív	Minden $1{,}0 \times 10^{-5}$ M-nél kisebb koncentrációnak megfelelő adatpont az EC_{80} érték felett helyezkedik el (ami megegyezik az E2 válasz 80 %-ával vagy 8 000 RLU-val).
Nem megfelelő	Azok az adatok nem tekinthetők hitelesnek, amelyek jelentős kvalitatív vagy kvantitatív korlátok miatt az aktivitás meglétét vagy hiányát mutatják, és ezért nem megfelelőnek kell minősíteni azokat, és nem használhatók fel a vizsgálati vegyi anyag pozitívként vagy negatívként való besorolásához. Ilyenkor a vegyi anyagot újbóli vizsgálatnak kell alávetni.

▼M8

40. A pozitív eredményeket – ha lehetséges – jellemezni kell mind a kiváltott hatás mértékével, mind a hatást előidéző koncentrációval. A pozitív, negatív és nem megfelelő adatokra az 5. és a 6. ábra szolgáltat példákat.

5. ábra

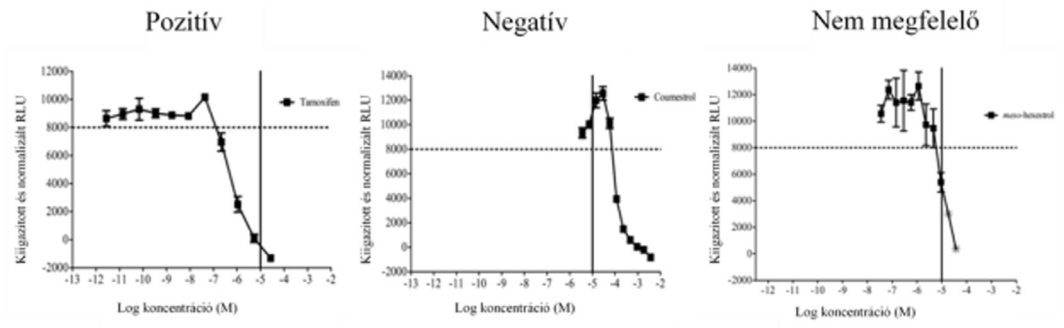
Agonista példák: pozitív, negatív és nem megfelelő adatok



A szaggatott vonal az E2 válasz 20 %-át jelzi, ami 2 000 kiigazított és normalizált RLU-nak felel meg.

6. ábra

Antagonista példák: pozitív, negatív és nem megfelelő adatok



A szaggatott vonal a Ral/E2 válasz 80 %-át jelzi, ami 8 000 kiigazított és normalizált RLU-nak felel meg.

Az egybefüggő vonal az 1,00 x 10^{-5} M koncentrációt jelzi. Ahhoz, hogy egy választ pozitívnak lehessen tekinteni, alatta kell maradnia a 8 000 RLU-t jelző vonalon, és a koncentrációja nem haladhatja meg az 1,00 x 10^{-5} M értéket.

A meso-hexestrol grafikonon csillaggal jelzett koncentrációk „2” vagy annál nagyobb életképességi pontszámot jeleznek.

A meso-hexestrol vizsgálat eredményei nem megfelelőnek tekintendők, mert az egyetlen 8 000 RLU alatti válasz 1,00 x 10^{-5} M koncentrációnál fordul elő.

41. Az EC_{50} és az IC_{50} érték kiszámítható a négy paraméteres Hill-féle funkcióanalízis alkalmazásával (részleteket lásd az agonista és az antagonista protokollban (7)). Az elfogadhatósági kritériumok teljesítése jelzi a rendszer megfelelő működését, de nem garantálja az egyes vizsgálatmenetek adatainak pontosságát. Az adatok pontosságát az biztosítja a legjobban, ha az első vizsgálatmenet eredményei megismételhetők (lásd „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” című 19. pontot).

▼**M8**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

42. Lásd „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” című 20. pontot.

SZAKIRODALOM

(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): p. 270-273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: p. 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7 850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals*, In vitro* Mol. *Toxicol*., 13(1):67-82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol*., 71(10):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

4. Függelék

A VEGYI ANYAGOK ÖSZTROGÉNHATÁSÚ AGONISTA ÉS ANTAGONISTA AKTIVITÁSÁNAK ERA CALUX SEJTVONALLAL TÖRTÉNŐ ÉSZLELÉSÉRE SZOLGÁLÓ, STABILAN TRANSZFEKTÁLT HUMÁN ÖSZTROGÉNRECEPTOR ALFA TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

1. Az ösztrogénreceptor α CALUX transzaktivációs vizsgálat humán U2OS sejtvonalat használ a humán ösztrogénreceptor alfa (hERα) által közvetített ösztrogénhatású agonista és antagonista aktivitás észlelésére. A stabil transzfekciós ERα CALUX biológiai vizsgálat validálási tanulmányát a BioDetection Systems BV (Amszterdam, Hollandia) végezte, amely tanulmány bizonyította, hogy a vizsgálat tervezett felhasználása tekintetében releváns és megbízható (1). Az ERα CALUX sejtvonal kizárólag stabilan transzfektált humán ERα-t fejez ki (2) (3).

2. A vizsgálat kifejezetten azt a célt szolgálja, hogy a bioluminescencia mint végpont mérése révén észlelje a hERα által közvetített transzaktivációt. A bioluminescenciát általánosan alkalmazzák a biológiai vizsgálatok során, a magas jel/háttér arány miatt (4).

3. Az 1 μM-nél magasabb fitoösztrogén-koncentrációnál a luciferáz riportergén túlzott aktiválásáról számoltak be, ami nem receptorok által közvetített luminescenciához vezet (5) (6) (7). Ezért az ennél magasabb fitoösztrogén-koncentrációértékeket vagy a luciferáz-kifejeződést túlzottan aktiváló más hasonló vegyületeket körültekintően kell vizsgálni a stabilan transzfektált ösztrogénreceptor transzaktivációs vizsgálatok során (lásd a 2. függeléket).

4. E vizsgálat szabályozási célra való alkalmazása előtt el kell olvasni az „ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS” és „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részt. A vizsgálati módszerben használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

5. Ez a biológiai vizsgálat arra szolgál, hogy értékelje az ösztrogénreceptor ligandumhoz kötődését, és a receptor-ligandum komplex ezt követő transzlokációját a sejtmagba. A sejtmagban a receptor-ligandum komplex specifikus DNS válaszelemekhez kötődve transzaktivál egy szentjánosbogár luciferáz riportergént, ami megnöveli a luciferáz enzim celluláris kifejeződését. A luciferázhoz luciferin szubsztrátumot adagolnak, ezt követően a luciferin bioluminescens termékké alakul. A felszabaduló fény könnyen észlelhető, mennyisége luminométer segítségével meghatározható.

6. A vizsgálati rendszer stabilan transzfektált ERα CALUX sejteket alkalmaz. Az ERα CALUX sejtek a humán oszteoblasztás oszteoszarkóma U2OS sejtvonalból származnak. A humán U2OS sejteket a kalcium-foszfát transzfekciós módszerrel stabilan transzfektálták a 3xHRE-TATA-Luc és pSG5-neo-hERα konstrukciókkal. Az U2OS sejtvonal bizonyult a legjobb jelöltnek arra, hogy ösztrogén-reszponzív (és egyéb szteroidhormon-reszponzív) riporter sejtvonalként szolgáljon, ami azon a megfigyelésen alapul, hogy az U2OS sejtvonal csekély szintű endogén riporter aktivitást mutatott vagy egyáltalán nem mutatott endogén riporter aktivitást. Az endogén receptorok hiányát csak luciferáz riporter plazmidokkal mérték, amelyek a riporter ligandumok hozzáadását követően nem mutattak aktivitást. Emellett ez a sejtvonal erős hormon közvetítésű válaszokat adott hasonló receptorok tranziens transzfekciója esetén (2) (3) (8).

7. Amikor az ERα CALUX sejtvonallal vizsgálják a vegyi anyagok ösztrogénhatású vagy antiösztrogén-hatású aktivitását, szükség van elővizsgálatra és teljes körű vizsgálatmenetekre. Az elővizsgálat során állapítják meg a vizsgálati vegyi anyagok oldhatóságát, citotoxicitását és pontosított koncentrációtartományát a teljes körű vizsgálatokhoz. A teljes körű vizsgálatmenetekben az

▼M8

ERα CALUX biológiai vizsgálat során tesztelik a vizsgálati vegyi anyagok pontosított koncentrációtartományát, majd agonista vagy antagonista aktivitás szempontjából elvégzik besorolásukat.

8. Az adatok értelmezésének kritériumait részletesen a 59. pont ismerteti. Röviden: a vizsgálati vegyi anyag akkor tekinthető pozitív agonistának, ha az anyag legalább két egymást követő koncentrációértéke olyan választ ad, amely megegyezik a referenciaszabványként használt 17β-ösztradiol maximális válaszának 10 %-ával (PC_{10}), illetve meghaladja azt. A vizsgálati vegyi anyag akkor minősíthető pozitív antagonistának, ha az anyag legalább két egymást követő koncentrációértéke olyan választ ad, amely megegyezik a referenciaszabványként használt tamoxifén maximális válaszának 80 %-ával (PC_{80}), illetve alacsonyabb annál.

ELJÁRÁS

Sejtvonalak

9. A vizsgálathoz stabilan transzfektált U2OS ERα CALUX sejtvonalat kell használni. A sejtvonal szakmai licencszerződés birtokában szerezhető be a BioDetection Systems BV vállalattól (Amszterdam, Hollandia).

10. Csak mikoplazmamentes sejtkultúrák használhatók. A felhasznált sejttételeknek vagy igazoltan mikoplazmafertőzés-mentesnek kell lenniük, vagy használat előtt el kell végezni rajtuk egy mikoplazma vizsgálatot. A mikoplazma-fertőzés detektálására az RT-PCR (valós idejű polimeráz láncreakció) alkalmazandó (9).

A sejtvonal stabilitása

11. A CALUX sejtek stabilitásának és integritásának megőrzése érdekében a sejteket folyékony nitrogénben (-80 ^{0}C-on) kell tárolni. Miután felolvasztották a sejteket, hogy új tenyészetet hozzanak létre, a sejteket legalább kétszer át kell ültetni, mielőtt felhasználnák azokat vegyi anyagok ösztrogénhatású agonista és antagonista aktivitásának értékelésére. A sejteket legfeljebb 30 alkalommal szabad passzálni.

12. Annak nyomon követése érdekében, hogy a sejtvonal az idő múlásával is megőrzi stabilitását, a referenciaszabvány EC_{50} vagy IC_{50} értékének mérésével ellenőrizni kell az agonista és antagonista vizsgálati rendszer válaszadási képességét. Emellett ellenőrizni kell a pozitív kontrollminta (PC) és a negatív kontrollminta (NC) relatív indukciós képességét. Az eredményeknek meg kell felelniük az ERα CALUX biológiai vizsgálat agonista (3C táblázat) vagy antagonista (4C táblázat) tesztjére vonatkozó elfogadhatósági kritériumoknak. Az agonista, illetve az antagonista vizsgálat referenciaszabványát, pozitív és negatív kontrollanyagát az 1. táblázat, illetve a 2. táblázat ismerteti.

Sejttenyésztés és a leültetés körülményei

13. Az U2OS sejteket pH-indikátor fenolvöröst tartalmazó, továbbá magzati borjú szérummal (7,5 %), nem esszenciális aminosavakkal (1 %), 10 egység/ml penicillinnel és sztreptomicinnel, valamint szelekciós markerként szolgáló geneticinnel (G-418) kiegészített tápoldatban (DMEM/F12 (1: 1)) kell tenyészteni. A sejteket 5 %-os CO_2-tartalmú inkubátorba kell helyezni, 37° C-os hőmérséklet és 100 %-os páratartalom biztosítása mellett. 85–95 %-os konfluencia elérését követően a sejteket vagy tovább kell oltani, vagy elő kell készíteni a 96 lyukú mikrotiterlemezekbe történő leoltáshoz. Ez utóbbi esetben a sejteket egy ösztrogénmentes DMEM/F12 (1: 1) tápoldatban 1 x 10^5 sejt/ml sűrűségben felszuszpendálják és a homogenizált sejtszuszpenziót 100 µl-ként kiszélesztik a 96 lyukú mikrotiterlemezek lyukaiba, a tápoldat itt fenolvörösmentes, tartalmaz 5 térfogatszázalék dextránbevonatú aktív szénnel kezelt magzati borjú szérumot, 1 térfogatszázalék nem esszenciális aminosavakat és 10 egység/ml penicillin és sztreptomicint). A kezelést megelőzően a sejteket CO_2 inkubátorban (5 % CO_2, 37 ^{0}C, 100 % páratartalom) 24 órán keresztül preinkubálni kell. A műanyag edények legyenek ösztrogénmentesek.

▼M8

Elfogadhatósági kritériumok

14. A vizsgálati vegyi anyag(ok) agonista és antagonista aktivitását egy vizsgálatsorozaton keresztül mérik fel. Egy vizsgálatsorozat legfeljebb 6 mikrotiterlemezből áll. Minden vizsgálatsorozat magában foglalja a referenciaszabvány egy teljes oldatsorozatát, egy pozitív kontrollmintát, egy negatív kontrollmintát és az oldószeres kontrollokat. Az 1. és a 2. ábra ismerteti az agonista és az antagonista vizsgálatsorozatokhoz használt lemez elrendezését.

15. A referenciaszabványok, a vizsgálati vegyi anyagok, az oldószeres kontrollanyagok, valamint a pozitív és negatív kontrollanyagok minden egyes oldatát triplikátumban kell vizsgálni. Mindhárom ismétlés eredményeinek meg kell felelniük a 3A és 4A táblázatban szereplő követelményeknek.

16. Minden vizsgálatsorozat első lemezén megmérik a referenciaszabvány (agonista vizsgálat esetén a 17β-ösztradiol; antagonista vizsgálat esetén a tamoxifén) teljes oldatsorozatát. Annak érdekében, hogy a másik 5 mikrotiterlemez elemzésének eredményeit össze lehessen vetni a referenciaszabvány teljes koncentráció-válasz görbéjét tartalmazó első mikrotiterlemezzel, minden lemeznek 3 kontrollmintát kell tartalmaznia: az oldószeres kontrollt, a vizsgált referenciaszabvány legmagasabb koncentrációját és a referenciaszabvány körülbelüli EC_{50} (agonista) vagy IC_{50} (antagonista) koncentrációját. Az első lemez és a másik 5 lemez kontrollmintái átlagának aránya meg kell feleljen a 3C táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4C táblázatban (antagonista vizsgálat) feltüntetett követelményeknek.

17. Meg kell határozni a vizsgálatsorozatán belüli egyes mikrotiterlemezek z-tényezőjét (10). A z-tényezőt a referenciaszabvány legmagasabb és legalacsonyabb koncentrációjánál kapott válasz alapján kell kiszámítani. A mikrotiterlemezek eredményei akkor tekinthetők hitelesnek, ha eleget tesznek a 3C táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4C táblázatban (antagonista vizsgálat) feltüntetett követelményeknek.

18. A referenciaszabványnak szigmoid formájú dózis-válasz görbét kell eredményeznie. A referenciaszabvány oldatsorozatának válaszai alapján meghatározott EC_{50} vagy IC_{50} értéknek meg kell felelnie a 3C táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4C táblázatban (antagonista vizsgálat) szereplő követelményeknek.

19. Minden vizsgálatsorozatnak tartalmaznia kell egy pozitív és egy negatív kontrollmintát. Mind a pozitív, mind a negatív kontrollminta kalkulált relatív indukciós hatásának eleget kell tennie a 3C táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4C táblázatban (antagonista vizsgálat) feltüntetett követelményeknek.

20. A referenciaszabvány legmagasabb koncentrációjának indukciós faktorát minden mérés során úgy határozzák meg, hogy elosztják a 17β-ösztradiol referenciaszabvány átlagos legmagasabb relatív fényegység (RLU) válaszát a referencia oldószerrel végzett kontroll átlagos RLU-válaszával. Az indukciós faktornak eleget kell tennie a 3C táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4C táblázatban (antagonista vizsgálat) feltüntetett, indukciós faktorra vonatkozó követelményeknek.

21. Kizárólag a fenti elfogadhatósági kritériumoknak megfelelő mikrotiterlemezek tekinthetők hitelesnek, és használhatók fel a vizsgálati vegyi anyagok által adott válasz értékelésére.

22. Az elfogadhatósági kritériumok egyaránt vonatkoznak az elővizsgálatra és a teljes körű vizsgálatmenetekre.

▼M8

1. táblázat

Az agonista CALUX biológiai vizsgálathoz használt referenciaszabvány, pozitív kontrollanyag (PC) és negatív kontrollanyag (NC) koncentrációi

	Anyag	CAS-szám	Vizsgálati tartomány (M)
Referenciaszabvány	17β-ösztradiol	50-28-2	$1*10^{-13}$–$1*10^{-10}$
Pozitív kontroll (PC)	17α-metiltesztoszteron	58-18-4	$3*10^{-6}$
Negatív kontroll (NC)	kortikoszteron	50-22-6	$1*10^{-8}$

2. táblázat

Az antagonista CALUX biológiai vizsgálathoz használt referenciaszabvány, pozitív kontrollanyag (PC) és negatív kontrollanyag (NC) koncentrációi

	Anyag	CAS-szám	Vizsgálati tartomány (M)
Referenciaszabvány	tamoxifén	10540-29-1	$3*10^{-9}$–$1*10^{-5}$
Pozitív kontroll (PC)	4-hidroxitamoxifén	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Negatív kontroll (NC)	rezveratrol	501-36-0	$1*10^{-5}$

3. táblázat

Az agonista ERα CALUX biológiai vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

A – egy lemezen lévő egyes minták		**Kritérium**
1	A három ismétlésben vizsgált lyukak maximális SD-ja %-ban (a NC, a PC, a vizsgálati vegyi anyag és a referenciaszabvány minden oldata tekintetében, kivéve C0)	< 15 %
2	A három ismétlésben vizsgált lyukak maximális SD-ja %-ban (a referenciaszabvány és a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrolljai tekintetében (C0, SC))	< 30 %
3	Az LDH maximális csökkenése, ami a citotoxicitás mérőszáma.	< 120 %
B – egy mikrotiterlemezen belül		
4	A referenciaszabvány oldószeres kontrolljának (C0; 1. lemez) és a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrolljának (SC; 2–x. lemez) aránya	0,5–2,0
5	A kb. EC_{50} és a referenciaszabvány legmagasabb koncentrációjának aránya az 1. lemezen, valamint a kb. EC_{50} és a referenciaszabvány legmagasabb koncentrációjának aránya a 2–x. lemezen (C4, C8)	0,70–1,30
6	Az egyes lemezek z-tényezője	> 0,6
C – egy analízissorozaton belül (egy sorozat összes lemeze)		
7	A referenciaszabvány görbéje szigmoid formájú	Igen (17ß-ösztradiol)
8	A 17ß-ösztradiol referenciaszabvány EC_{50} tartománya	$4*10^{-12}$–$4*10^{-11}$ M
9	A legmagasabb 17β-ösztradiol koncentráció minimális indukciós faktora, a referenciaszabvány oldószeres kontrolljához képest.	5
10	PC relatív indukciója (%)	> 30 %
11	NC relatív indukciója (%)	< 10 %

▼M8

Kb.: körülbelüli; PC: pozitív kontroll; NC: negatív kontroll; SC: a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrollja; C0: a referenciaszabvány oldószeres kontrollja; SD: standard deviáció; LDH: laktát-dehidrogenáz.

4. táblázat

Az antagonista ERα CALUX biológiai vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

A – egy lemezen lévő egyes minták		**Kritérium**
1	A három ismétlésben vizsgált lyukak maximális SD-ja %-ban (az NC, a PC, a vizsgálati vegyi anyag és a referenciaszabvány minden oldata, valamint az oldószeres kontroll (C0) tekintetében)	< 15 %
2	A három ismétlésben vizsgált lyukak maximális SD-ja %-ban (a vivőanyag kontroll (VC) és a referenciaszabvány legmagasabb koncentrációja (C8) tekintetében)	< 30 %
3	Az LDH maximális csökkenése, ami a citotoxicitás mérőszáma.	< 120 %
B – egy mikrotiterlemezen belül		
4	A referenciaszabvány oldószeres kontrolljának (C0; 1. lemez) és a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrolljának (SC; 2–x. lemez) aránya	0,70–1,30
5	Az 1. lemez referenciaszabvány-koncentrációinak kb. IC_{50} értékének és a 2–x. lemez referenciaszabvány-koncentrációinak kb. IC_{50} értékének (C4) aránya	0,70–1,30
6	Az 1. lemez legmagasabb referenciaszabvány-koncentrációinak és a 2–x. lemez legmagasabb referenciaszabvány-koncentrációinak (C8) aránya	0,50–2,0
7	Az egyes lemezek z-tényezője	> 0,6
C – egy analízissorozaton belül (egy sorozat összes lemeze)		
8	A referenciaszabvány görbéje szigmoid formájú	Igen (tamoxifén)
9	A referenciaszabvány (tamoxifén) IC_{50} tartománya	$1*10^{-8}$–$1*10^{-7}$ M
10	A referenciaszabvány oldószeres kontrolljának minimális indukciós faktora, a tamoxifén legmagasabb koncentrációjához képest.	2,5
11	PC relatív indukciója (%)	< 70 %
12	NC relatív indukciója (%)	> 85 %

Kb.: körülbelüli; PC: pozitív kontroll; NC: negatív kontroll; VC: vivőanyagos kontroll (az agonista referenciaszabvány fix koncentrációja nélküli oldószeres kontroll); SC: a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrollja; C0: a referenciaszabvány oldószeres kontrollja; SD: standard deviáció; LDH: laktát-dehidrogenáz.

Oldószeres/vivőanyagos kontroll, referenciaszabványok, pozitív kontrollok, negatív kontrollok

23. Mind az elővizsgálatban, mind a teljes körű vizsgálatmenetekben ugyanazt a kontrollként szolgáló oldószert/vivőanyagot, referenciaszabványokat, pozitív és negatív kontrollanyagokat kell használni. Emellett változatlanul kell hagyni a referenciaszabványok, pozitív és negatív kontrollanyagok koncentrációértékeit is.

▼M8

Oldószeres kontroll

24. A vizsgálati vegyi anyagok feloldására használt oldószert oldószeres kontroll keretében vizsgálni kell. Az ERα CALUX biológiai vizsgálat validálása során vivőanyagként dimetil-szulfoxidot alkalmaztak (DMSO, 1 térfogatszázalékban, CAS-száma: 67-68-5). DMSO-tól eltérő oldószer használata esetén valamennyi referenciaszabványt, kontrollanyagot és vizsgálati vegyi anyagot ugyanabban a vivőanyagban kell tesztelni. Az antagonista tanulmányok oldószeres kontrollja fix koncentrációban (körülbelül EC_{50} koncentrációban) tartalmazza az agonista referenciaszabványt, a 17β-ösztradiolt. Az antagonista tanulmányokhoz használt oldószer teszteléséhez vivőanyagos kontrollt kell készíteni és tesztelni.

Vivőanyagos kontroll (antagonista vizsgálat)

25. Az antagonista hatás vizsgálatához a vizsgálati tápoldatot az agonista referenciaszabvány, a 17β-ösztradiol fix koncentrációjával (körülbelül EC_{50} koncentrációval) egészítik ki. Az antagonista hatásuk felmérése céljából vizsgált vizsgálati vegyi anyagok feloldásához alkalmazott oldószer teszteléséhez az agonista referenciaszabványként használt 17β-ösztradiol fix koncentrációjától mentes vizsgálati közeget kell készíteni. Ez a kontrollminta az úgynevezett vivőanyagos kontroll. Az ERα CALUX biológiai vizsgálat validálása során vivőanyagként dimetil-szulfoxidot alkalmaztak (DMSO, 1 térfogatszázalékban, CAS-száma: 67-68-5). DMSO-tól eltérő oldószer használata esetén valamennyi referenciaszabványt, kontrollanyagot és vizsgálati vegyi anyagot ugyanabban a vivőanyagban kell tesztelni.

Referenciaszabványok

26. Az agonista referenciaszabvány a 17β-ösztradiol (1. táblázat). A referenciaszabványok a 17β-ösztradiol nyolc koncentrációjából álló oldatsorozatot foglalnak magunkban ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. Az antagonista referenciaszabvány a tamoxifén (2. táblázat). A referenciaszabványok egy, a tamoxifén nyolc koncentrációjából álló oldatsorozatot foglalnak magunkban ($3*10^{-9}$, $1*10^{-8}$, $3*10^{-8}$, $1*10^{-7}$, $3*10^{-7}$, $1*10^{-6}$, $3*10^{-6}$, $1*10^{-5}$ M). Az antagonista referenciaszabvány minden egyes koncentrációját együtt inkubálják az agonista referenciaszabványként szolgáló 17β-ösztradiol fix koncentrációjával ($3*10^{-12}$ M).

Pozitív kontroll

28. Az agonista tanulmányok pozitív kontrollanyaga a 17α-metiltesztoszteron (1. táblázat).

29. Az antagonista tanulmányok pozitív kontrollanyaga a 4-hidroxitamoxifén (2. táblázat). Az antagonista pozitív kontrollanyagot együtt inkubálják az agonista referenciaszabványként szolgáló 17β-ösztradiol fix koncentrációjával ($3*10^{-12}$ M).

Negatív kontroll

30. Az agonista tanulmányok negatív kontrollanyaga a kortikoszteron (1. táblázat).

31. Az antagonista tanulmányok negatív kontrollanyaga a rezveratrol (2. táblázat). Az antagonista negatív kontrollanyagot együtt inkubálják az agonista referenciaszabványként szolgáló 17β-ösztradiol fix koncentrációjával ($3*10^{-12}$ M).

▼M8

A laboratórium jártasságának igazolása (lásd a vizsgálati módszer „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részének 14. pontját, valamint 3. és 4. táblázatát).

Vivőanyag

32. A vizsgálati vegyi anyagok feloldásához olyan oldószert kell használni, amelyik teljesen szolubilizálja a vizsgálati vegyi anyagot és elegyedik a sejtek tápoldatával. A megfelelő oldószerek közé tartozik a DMSO, a víz és az etanol (95–100 %-os tisztaságban). Amennyiben DMSO-t használnak oldószerként, az inkubálás alatt a DMSO maximális koncentrációja nem haladhatja meg az 1 térfogatszázalékot. Az oldószert alkalmazása előtt tesztelni kell, hogy nem okoz-e citotoxicitást, és nem zavarja-e a vizsgálatok teljesítményét.

A referenciaszabványok, a pozitív és negatív kontrollanyagok, valamint a vizsgálati vegyi anyagok előkészítése

33. A referenciaszabványokat, a pozitív és negatív kontrollanyagokat, valamint a vizsgálati vegyi anyagokat 100 %-os DMSO-ban (vagy más megfelelő oldószerben) kell feloldani. A megfelelő oldatokat (oldatsorozatot) ugyanabban az oldószerben kell elkészíteni. Feloldás előtt meg kell várni, hogy minden anyag szobahőmérsékletű legyen. A referenciaszabványok, a pozitív és negatív kontrollanyagok, valamint a vizsgálati vegyi anyagok frissen készített törzsoldataiban nem lehet szemmel látható kicsapódás és az oldatok nem lehet zavarosak. A referenciaszabványok és kontrollanyagok nagy tételben is előkészíthetők. A vizsgálati vegyi anyagok törzsoldatait minden kísérlet előtt frissen kell elkészíteni. A referenciaszabványok, a pozitív és negatív kontrollanyagok, valamint a vizsgálati vegyi anyagok végső oldatait minden egyes kísérlethez frissen kell készíteni, és az elkészítéstől számított 24 órán belül fel kell használni.

Oldhatóság, citotoxicitás és dózisbehatárolás

34. Az elővizsgálat során meghatározzák a vizsgálati vegyi anyagok választott oldószerben való oldhatóságát. Elkészítik a maximális, 0,1 M törzsoldatkoncentrációt. Amennyiben ennél a koncentrációnál oldhatósági problémák jelentkeznek, alacsonyabb koncentrációjú törzsoldatokat kell készíteni mindaddig, amíg a vizsgálati vegyi anyagok teljesen oldhatónak nem bizonyulnak. Az elővizsgálat során a vizsgálati vegyi anyagok 1: 10 arányú oldatsorozatát tesztelik. Az agonista és antagonista vizsgálat maximális vizsgált koncentrációja az 1 mM. Az elővizsgálat megfelelően pontosítja a vizsgálati vegyi anyagok koncentrációtartományát, a teljes körű vizsgálatmenetek során ezt a tartományt kell vizsgálni. A teljes körű vizsgálat során a következő hígítási arányokat kell alkalmazni: 1x-es, 3x-os, 10x-es, 30x-os, 100x-os, 300x-os, 1000x-es és 3000x-es.

35. A citotoxicitás vizsgálata egyaránt része az agonista és az antagonista vizsgálati protokollnak (11). Mind az elővizsgálat, mind a teljes körű vizsgálatmenetek tartalmaznak citotoxicitási vizsgálatot. Az ERα CALUX biológiai vizsgálat validálása során a citotoxicitás felmérésére a laktát-dehidrogenáz (LDH) szivárgását vizsgáló tesztet használták, és emellett kvalitatív vizuális módszerrel (lásd a 4.1. függeléket) megfigyelték a vizsgálati vegyi anyagokkal kezelt sejteket. Ugyanakkor a citotoxicitás meghatározásához használhatók más kvantitatív módszerek is (pl. a tetrazólium alapú kolorimetriás (MTT) vizsgálat vagy a CALUX citotoxicitási biológiai vizsgálat). Általában véve a vizsgálati vegyi anyagok azon koncentrációi, amelyek a sejtéletképesség több mint 20 %-os visszaesését okozzák, citotoxikusnak tekintendők, így az adatok értékeléséhez nem használhatók. Az LDH szivárgását vizsgáló teszt esetében a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja akkor minősül citotoxikusnak, ha az LDH-szivárgás aránya meghaladja a 120 %-ot.

▼M8

Vegyi anyaggal történő kezelés és a vizsgálati lemez elrendezése

36. A megfelelő sűrűséget elérő sejtkultúra sejtjeit tripszin hozzáadással elválasztják a sejttenyésztő edény aljától, majd a sejteket ösztrogénmentes vizsgálati tápoldatban 1 x 10^5 sejt/ml sűrűségre állítják be. Az újraszuszpendált sejteket 100 µl mennyiségben kiszélesztik a 96 lyukú mikrotiterlemez belső lyukaiba. A lemezen a szélső sorok lyukait 200 µl foszfátpuffert tartalmazó sóoldattal (PBS) töltik meg (lásd az 1. és 2. ábrát). A leültetett sejteket 24 órán keresztül CO_2 inkubátorban preinkubálják (5 % CO_2, 37 °C, 100 % páratartalom mellett).

37. A preinkubációt követően a lemezeken megfigyelik a citotoxicitás (lásd a 4.1. függeléket), a fertőzés és a konfluencia szabad szemmel látható jeleit. A vizsgálathoz kizárólag olyan lemezek használhatók fel, amelyeken nem látható citotoxicitás és fertőzés, a konfluencia mértéke pedig eléri a 85 %-ot. A belső lyukakban lévő sejtekről óvatosan lecserélik a tápoldatot, és 200 µl ösztrogénmentes vizsgálati tápoldattal töltik fel, amely tartalmazza a referenciaszabványok, a vizsgálati vegyi anyagok, a pozitív és negatív kontrollanyagok és az oldószerek megfelelő oldatsorozatát (5. táblázat: agonista tanulmányok; 6. táblázat: antagonista tanulmányok). A referenciaszabványokat, a vizsgálati vegyi anyagokat, a pozitív és a negatív kontrollanyagokat, valamint az oldószereket három ismétlésben kell vizsgálni. Az 1. ábra ismerteti az agonista vizsgálati lemez elrendezését. A 2. ábra ismerteti az antagonista vizsgálati lemez elrendezését. Az elővizsgálathoz és a teljes körű vizsgálathoz alkalmazott lemezek elrendezése azonos. Az antagonista vizsgálat során minden belső lyuk – a vivőanyagot (VC) tartalmazó lyukakat kivéve – tartalmazza az agonista referenciaszabványként szolgáló 17β-ösztradiol fix koncentrációját is ($3*10^{-12}$ M). C8-as és C4-es koncentrációjú referenciaszabványnak szerepelnie kell minden vizsgálati vegyi anyagot tesztelő lemezen.

38. Miután minden vegyi anyaggal kezelték a sejteket, a 96 lyukú mikrotiterlemezeket ismét 24 órán keresztül CO_2 inkubátorban inkubálják (5 % CO_2, 37 °C, 100 % páratartalom mellett).

1. ábra

A 96 lyukú mikrotiterlemezek elrendezése agonista hatás elővizsgálathoz és értékeléséhez

1. lemez

	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	NK	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK	
H												

Többi lemez

	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 = a referenciaszabvány oldószere.

C(1–8) = a referenciaszabvány oldatsorozata (1–8, az alacsonytól a magas koncentráció felé).

▼M8

PC = pozitív kontroll.

NK = negatív kontroll.

TCx-(1–8) = vizsgálati vegyi anyag oldatai (1–8, az alacsonytól a magas koncentráció felé) az x. vizsgálati vegyi anyag elővizsgálatához és agonista hatásának felméréséhez.

SC = a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrollja (optimális esetben azonos a C0-val, de lehetőleg másik tételből származzon).

Szürke cellák: = szélső lyukak, 200 µl PBS-sel feltöltve.

2. ábra

A 96 lyukú mikrotiterlemezek elrendezése antagonista hatás elővizsgálathoz és értékeléséhez

1. lemez

	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		NK	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NK	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NK	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Többi lemez

	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 = a referenciaszabvány oldószere.

C(1–8) = a referenciaszabvány oldatsorozata (1–8, az alacsonytól a magas koncentráció felé).

NK = negatív kontroll.

PC = pozitív kontroll.

TCx-(1–8) = vizsgálati vegyi anyag oldatai (1–8, az alacsonytól a magas koncentráció felé) az x. vizsgálati vegyi anyag elővizsgálatához és agonista hatásának felméréséhez.

SC = a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrollja (optimális esetben azonos a C0-val, de lehetőleg másik tételből származzon).

VC = vivőanyagos kontroll (oldószeres kontroll, az agonista referenciaszabvány, a 17β-ösztradiol fix koncentrációja nélkül).

Szürke cellák: = szélső lyukak, 200 µl PBS-sel feltöltve.

Megjegyzés: minden belső lyuk – a vivőanyagot (VC) tartalmazó lyukakat kivéve – magában foglalja az agonista referenciaszabványként szolgáló 17β-ösztradiol fix koncentrációját is ($3{,}0*10^{-12}$ M).

A lumineszcencia mérése

39. A lumineszcencia mérésének részletes leírása megtalálható az agonista és az antagonista vizsgálati protokollban (10). A lyukakban lévő tápoldatot el kell távolítani, majd a sejteket 24 órás inkubálást követően lizálni kell, hogy feltárják a sejtmembránt, és mérhetővé váljon a luciferáz-aktivitás.

▼M8

40. A lumineszcencia méréséhez ebben az eljárásban 2 injektorral felszerelt luminométert kell használni. A luciferáz reakció megkezdéséhez beinjektálják a luciferin szubsztrátot. A reakciót 0,2 M NaOH hozzáadásával állítják le. A reakciót azért kell leállítani, hogy ne terjedjen át a lumineszcencia az egyik lyukból a másikba.

41. Az egyes lyukak által kibocsátott fényt lyukankénti relatív fényegységekben (RLU-ban) fejezik ki.

Elővizsgálat

42. Az elővizsgálat elemzésének eredményei alapján határozzák meg a vizsgálati vegyi anyagok teljes körű vizsgálatban alkalmazandó pontosított koncentrációtartományát. Az elővizsgálat eredményeinek értékeléséről és a vizsgálati vegyi anyagok teljes körű vizsgálatban alkalmazandó pontosított koncentrációtartományáról az agonista és az antagonista vizsgálati protokoll nyújt részletes tájékoztatást (10). Az alábbiak csak röviden összefoglalják azt az eljárást, amelynek alapján meghatározható az agonista és az antagonista vizsgálatban használt vizsgálati vegyi anyagok koncentrációtartománya. Az oldatsorozat elemeinek meghatározásához az 5. és a 6. táblázat nyújt iránymutatást.

Az agonista hatások felmérésére szolgáló koncentrációértékek kiválasztása

43. Az elővizsgálat során a vizsgálati vegyi anyagokat az 5. táblázatban (agonista vizsgálat) és a 6. táblázatban (antagonista vizsgálat) jelzett oldatsorozatban kell vizsgálni. Minden koncentrációértéket három-három lyukban kell vizsgálni, az 1. ábrán (agonista vizsgálat) és a 2. ábrán (antagonista vizsgálat) szereplő lemezelrendezésben.

44. Kizárólag az analízis elfogadhatósági kritériumoknak (3. táblázat) megfelelő eredményei tekinthetők hitelesnek, és használhatók fel a vizsgálati vegyi anyagok válaszának értékelésére. Amennyiben az elemzéssorozat egy vagy több mikrotiterlemeze nem felel meg az elfogadhatósági kritériumoknak, az adott mikrotiterlemezeket újbóli elemzésnek kell alávetni. Ha a referenciaszabvány teljes sorozatát tartalmazó első lemez nem teljesíti az elfogadhatósági kritériumokat, ismételten el kell végezni az egész vizsgálatsorozat (mind a 6 lemez) elemzését.

45. A vizsgálati vegyi anyagok kezdeti koncentrációtartományait ki kell igazítani és az elővizsgálatot meg kell ismételni, ha:

— citotoxicitást figyeltek meg. Ilyenkor az elővizsgálatot a vizsgálati vegyi anyag alacsonyabb, nem citotoxikus koncentrációival kell megismételni;

— a vizsgálati vegyi anyag elővizsgálata nem biztosított teljes dózis-válasz görbét, mert a vizsgált koncentrációértékek maximális indukciót idéztek elő. Ilyenkor az elővizsgálatot a vizsgálati vegyi anyag alacsonyabb koncentrációival kell megismételni.

46. Érvényes dózisfüggő válasz esetén azt a (legalacsonyabb) koncentrációt kell kiválasztani, amely maximális indukciót hoz létre, ugyanakkor nem okoz citotoxicitást. A vizsgálati vegyi anyag teljes körű vizsgálatmenetekben tesztelendő legnagyobb koncentrációja e kiválasztott koncentráció háromszorosa legyen.

47. A vizsgálati vegyi anyag pontosított teljes oldatsorozatát az 5. táblázatban szereplő hígítási lépések szerint kell elkészíteni, kiindulva a fenti eljárás alapján meghatározott legnagyobb koncentrációtól.

▼M8

48. Azokat a vizsgálati vegyi anyagokat, amelyek nem váltanak ki agonista hatást, az elővizsgálat során azonosított legnagyobb nem toxikus koncentrációtól kezdve kell vizsgálni a teljes körű vizsgálatban.

Az antagonista hatások felmérésére szolgáló koncentrációértékek kiválasztása

49. Kizárólag az analízis elfogadhatósági kritériumoknak (4. táblázat) megfelelő eredményei tekinthetők hitelesnek, és használhatók fel a vizsgálati vegyi anyagok válaszának értékelésére. Amennyiben az elemzéssorozat egy vagy több mikrotiterlemeze nem felel meg az elfogadhatósági kritériumoknak, az adott mikrotiterlemezeket újbóli elemzésnek kell alávetni. Ha a referenciaszabvány teljes sorozatát tartalmazó első lemez nem teljesíti az elfogadhatósági kritériumokat, ismételten el kell végezni az egész vizsgálatsorozat (mind a 6 lemez) elemzését.

50. A vizsgálati vegyi anyagok kezdeti koncentrációtartományait ki kell igazítani és az elővizsgálatot meg kell ismételni, ha:

— citotoxicitást figyeltek meg. Ilyenkor az elővizsgálatot a vizsgálati vegyi anyag alacsonyabb, nem citotoxikus koncentrációival kell megismételni;

— a vizsgálati vegyi anyag elővizsgálata nem biztosított teljes dózis-válasz görbét, mert a vizsgált koncentrációértékek maximális gátlást idéztek elő. Ilyenkor az elővizsgálatot a vizsgálati vegyi anyag alacsonyabb koncentrációival kell megismételni.

51. Érvényes dózisfüggő válasz esetén azt a (legalacsonyabb) koncentrációt kell kiválasztani, amely maximális gátlást hoz létre, ugyanakkor nem okoz citotoxicitást. A vizsgálati vegyi anyag teljes körű vizsgálatmenetekben tesztelendő legnagyobb koncentrációja e kiválasztott koncentráció háromszorosa legyen.

52. A vizsgálati vegyi anyag pontosított teljes oldatsorozatát a 6. táblázatban szereplő hígítási lépések szerint kell elkészíteni, kiindulva a fenti eljárás alapján meghatározott legnagyobb koncentrációtól.

53. Azokat a vizsgálati vegyi anyagokat, amelyek nem váltanak ki antagonista hatást, az elővizsgálat során tesztelt legnagyobb nem toxikus koncentrációtól kezdve kell vizsgálni a teljes körű vizsgálatban.

Teljes körű vizsgálatmenetek

54. A pontosított koncentrációtartományok meghatározását követően a teljes körű vizsgálatmenetek során a vizsgálati vegyi anyagokat az 5. táblázatban (agonista vizsgálat) és a 6. táblázatban (antagonista vizsgálat) jelzett oldatsorozatban kell vizsgálni. Minden koncentrációértéket három-három lyukban kell vizsgálni, az 1. ábrán (agonista vizsgálat) és a 2. ábrán (antagonista vizsgálat) szereplő lemezelrendezésben.

55. Kizárólag az analízis elfogadhatósági kritériumoknak (3. és 4. táblázat) megfelelő eredményei tekinthetők hitelesnek, és használhatók fel a vizsgálati vegyi anyagok válaszának értékelésére. Amennyiben az elemzéssorozat egy vagy több mikrotiterlemeze nem felel meg az elfogadhatósági kritériumoknak, az adott mikrotiterlemezeket újbóli elemzésnek kell alávetni. Ha a referenciaszabvány teljes sorozatát tartalmazó első lemez nem teljesíti az elfogadhatósági kritériumokat, ismételten el kell végezni az egész vizsgálatsorozat (mind a 6 lemez) elemzését.

▼M8

5. táblázat

Az agonista vizsgálathoz használt referenciaanyagok, kontrollanyagok és vizsgálati vegyi anyagok koncentrációi és oldatai

Referencia 17β-ösztradiol		TCx – elővizsgálat		TCx – teljes körű vizsgálatmenet		Kontrollok	
konc. (M)		oldatai		oldatai		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3000 x	PC	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1000 x	NK	$1*10^{-8}$
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	1000 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 – x. vizsgálati vegyi anyag
PC – pozitív kontroll (17α-metiltesztoszteron)
NK – negatív kontroll (kortikoszteron)
C0 – a referenciaszabvány oldószeres kontrollja
SC – a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrollja

▼**M8**

6. táblázat

Az antagonista vizsgálathoz használt referenciaanyagok, kontrollanyagok és vizsgálati vegyi anyagok koncentrációi és oldatai

Referencia tamoxifén		TCx – elővizsgálat		TCx – teljes körű vizsgálat-menet		Kontrollok	
konc. (M)		oldatai		oldatai		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3000 x	PC	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1000 x	NK	$1*10^{-5}$
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	**Hozzáadott agonista**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**konc. (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-ösztradiol	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx – x. vizsgálati vegyi anyag

PC – pozitív kontroll (4-hidroxitamoxifén)

NK – negatív kontroll (rezveratrol)

C0 – a referenciaszabvány oldószeres kontrollja

SC – a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrolljaVC –vivőanyagos kontroll (nem tartalmazza az agonista referenciaszabványként szolgáló 17β-ösztradiol fix koncentrációját ($3,0*10^{-12}$ M))

▼M8

Adatgyűjtés és adatelemzés

56. Az elővizsgálat és a teljes körű vizsgálatmenetek lefolytatását követően meg kell határozni az agonista vizsgálat EC_{10}, EC_{50}, PC_{10} és PC_{50} értéket, valamint a maximális indukciót (TCx_{max}). Antagonista vizsgálat esetében az IC_{20}, IC_{50}, PC_{80} és PC_{50} értéket, valamint a maximális indukciót (TCx_{max}) kell kiszámolni. E paraméterek grafikus ábrázolása látható a 3. ábrán (agonista vizsgálat) és 4. ábrán (antagonista vizsgálat). A szükséges paraméterek kiszámítása az egyes vizsgálati vegyi anyagok relatív (a 100 %-nak vett referenciaszabvány maximális indukciójához viszonyított) indukcióján alapul. Az adatok értékeléséhez nem lineáris regressziót (változó meredekség 4 paraméter alapján) kell alkalmazni, az alábbi egyenlet szerint:

$$Y = Görbe\ alja + \frac{(\text{Görbe teteje} - \text{Görbe alja})}{(1 + 10(lgEC_{50} - X) \times Hill - meredekség)}$$

ahol:

X = a dózis vagy a koncentráció logaritmusa

Y = válasz (relatív indukció (%))

Görbe teteje = maximális indukció (%)

Görbe alja = minimális indukció (%)

$LogEC_{50}$ = annak a koncentrációnak a logaritmusa, amely a maximális válasz 50 %-át idézi elő

Hill-meredekség = meredekségi tényező vagy Hill-meredekség

57. A luminométer által szolgáltatott, relatív fényegységekben (RLU) kifejezett nyers adatokat át kell vezetni az elővizsgálat és a teljes körű vizsgálatmenetek adatelemzése céljára létrehozott táblázatsablonba. A nyers adatoknak meg kell felelniük a 3A és 3B táblázatban (agonista vizsgálat) vagy a 4A és 4B táblázatban (antagonista vizsgálat) feltüntetett elfogadhatósági kritériumoknak. Amennyiben a nyers adatok megfelelnek az elfogadhatósági kritériumoknak, az alábbi kalkulációs lépéseken keresztül meg kell határozni a szükséges paramétereket:

Agonista vizsgálat

— Az egyes referenciaszabványok nyers adatainak elemzéséből származó eredményből vonjuk ki a referenciaszabvány oldószeres kontrolljának átlagos RLU-értékét.

— Az egyes vizsgálati vegyi anyagok nyers adatainak elemzéséből származó eredményből vonjuk ki a vizsgálati vegyi anyag oldószeres kontrolljának átlagos RLU-értékét.

— Számítsuk ki a referenciaszabvány egyes koncentrációértékeinek relatív indukcióját. Határozzuk meg 100 %-ként a referenciaszabvány legmagasabb koncentrációjának indukcióját.

— Számítsuk ki a vizsgálati vegyi anyagok egyes koncentrációinak a referenciaszabvány 100 %-nak vett legnagyobb koncentrációjához viszonyított, relatív indukcióját.

— Értékeljük az analízis eredményeit nem lineáris regresszió technikájával (változó meredekség, 4 paraméter).

▼M8

— Határozzuk meg a referenciaszabvány EC_{50} és EC_{10} értékét.

— Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok EC_{50} és EC_{10} értékét.

— Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok maximális relatív indukcióját (TC_{max}).

— Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok PC_{10} és PC_{50} értékét.

A vizsgálati vegyi anyagok esetében citotoxicitás vagy oldhatósági problémák miatt nem mindig hozható létre teljes dózis-válasz görbe. Ekkor nem lehet meghatározni az EC_{50}, EC_{10} és PC_{50} értékét. Ilyen esetben csak a PC_{10} és TC_{max} értéke határozható meg.

Antagonista vizsgálat

— Az egyes referenciaszabványok nyers adatainak elemzéséből származó eredményből vonjuk ki a referenciaszabvány legnagyobb koncentrációjának átlagos RLU-értékét.

— Az egyes vizsgálati vegyi anyagok nyers adatainak elemzéséből származó eredményből vonjuk ki a referenciaszabvány legnagyobb koncentrációjának átlagos RLU-értékét.

— Számítsuk ki a referenciaszabvány egyes koncentrációértékeinek relatív indukcióját. Határozzuk meg 100 %-ként a referenciaszabvány legalacsonyabb koncentrációjának indukcióját.

— Számítsuk ki a vizsgálati vegyi anyagok egyes koncentrációinak a referenciaszabvány 100 %-nak vett legalacsonyabb koncentrációjához viszonyított, relatív indukcióját.

— Értékeljük az analízis eredményeit nem lineáris regresszió technikájával (változó meredekség, 4 paraméter).

— Határozzuk meg a referenciaszabvány IC_{50} és IC_{20} értékét.

— Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok IC_{50} és IC_{20} értékét.

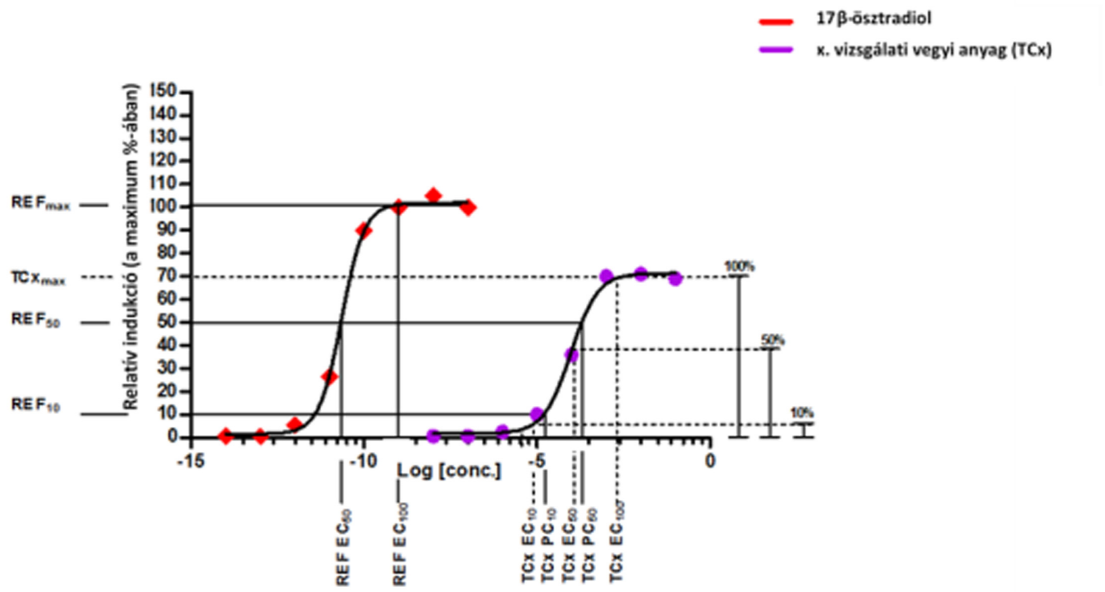
— Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok minimális relatív indukcióját (TC_{min}).

— Határozzuk meg a vizsgálati vegyi anyagok PC_{80} és PC_{50} értékét.

▼M8

3. ábra

Az agonista vizsgálatban meghatározott paraméterek áttekintése



EC_{10} = egy anyag azon koncentrációja, amely a maximális válaszának 10 %-át váltja ki.

EC_{50} = egy anyag azon koncentrációja, amely a maximális válaszának 50 %-át váltja ki.

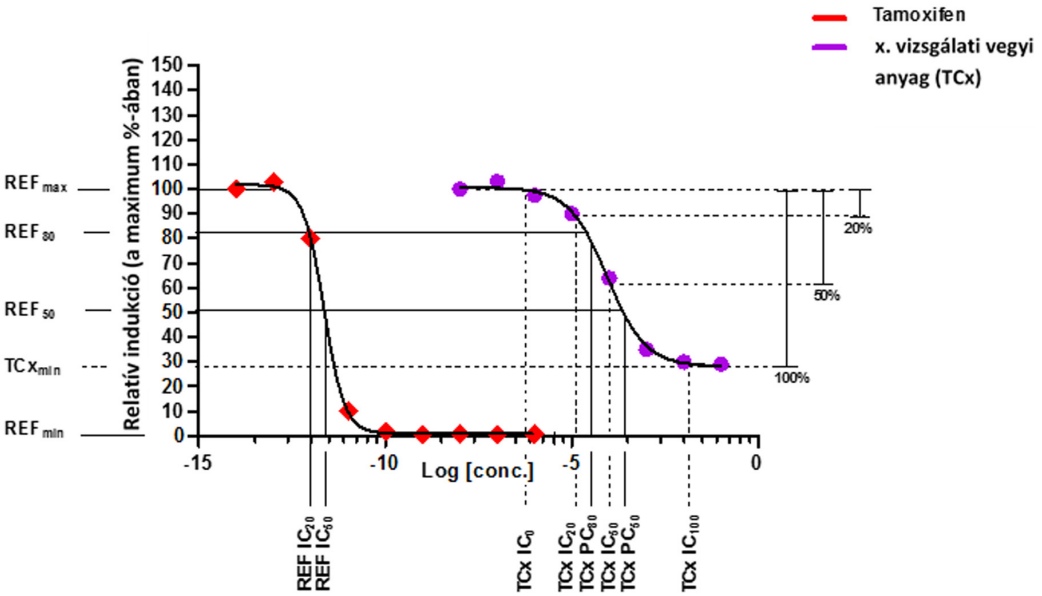
PC_{10} = egy vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a referenciaszabvány EC_{10} értékével megegyező választ vált ki.

PC_{50} = egy vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a referenciaszabvány EC_{50} értékével megegyező választ vált ki.

TCx_{max} = a vizsgálati vegyi anyag maximális relatív indukciója.

4. ábra

Az antagonista vizsgálatban meghatározott paraméterek áttekintése



IC20 = egy anyag azon koncentrációja, amely a maximális válaszának 80 %-át váltja ki (20 %-os gátlást idéz elő).

▼**M8**

IC50 = egy anyag azon koncentrációja, amely a maximális válaszának 50 %-át váltja ki (50 %-os gátlást idéz elő).

PC80 = egy vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a referenciaszabvány IC_{20} értékével megegyező választ vált ki.

PC50 = egy vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a referenciaszabvány IC_{50} értékével megegyező választ vált ki.

TCx_{min} = a vizsgálati vegyi anyag minimális relatív indukciója.

A vizsgálati vegyi anyagok esetében citotoxicitás vagy oldhatósági problémák miatt nem mindig hozható létre teljes dózis-válasz görbe. Ekkor nem lehet meghatározni az IC_{50}, IC_{20} és PC_{50} értékét. Ilyen esetben csak a PC_{20} és TC_{min} értéke határozható meg.

58. Az eredményeknek két (vagy három) független vizsgálatmeneten kell alapulniuk. Amennyiben két vizsgálatmenet összevethető, vagyis reprodukálható eredményeket ad, akkor harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség. Az eredmények akkor elfogadhatók, ha:

— teljesülnek az elfogadhatósági kritériumok (e kritériumokat lásd a 14–22. pontban),

— megismételhetők.

Az adatok értelmezésének kritériumai

59. Az adatok értelmezéséhez és annak eldöntéséhez, hogy egy adott vizsgálati vegyi anyag pozitív vagy negatív besorolást kapjon, az alábbi kritériumokat kell figyelembe venni:

Agonista vizsgálat

Minden teljes körű vizsgálatmenet tekintetében valamely vizsgálati vegyi anyag az alábbi esetben tekinthető **pozitívnak**:

1. A TC_{max} megegyezik a referenciaszabvány maximális válaszának 10 %-ával (REF_{10}), vagy meghaladja azt.

2. A vizsgálati vegyi anyag legalább 2 egymást követő koncentrációja megegyezik az REF_{10} értékével, vagy meghaladja azt.

Minden teljes körű vizsgálatmenet tekintetében valamely vizsgálati vegyi anyag az alábbi esetben tekinthető **negatívnak**:

1. A TC_{max} nem haladja meg a referenciaszabvány maximális válaszának 10 %-át (REF_{10}).

2. A vizsgálati vegyi anyag kevesebb mint két koncentrációja egyezik meg az REF_{10} értékével, vagy haladja meg azt.

Antagonista vizsgálat

Minden teljes körű vizsgálatmenet tekintetében valamely vizsgálati vegyi anyag az alábbi esetben tekinthető **pozitívnak**:

1. A TC_{min} megegyezik a referenciaszabvány maximális válaszának 80 %-ával (REF_{80} = 20 %-os gátlás), vagy alacsonyabb annál.

2. A vizsgálati vegyi anyag legalább 2 egymást követő koncentrációja megegyezik az REF_{80} értékével, vagy alacsonyabb annál.

▼**M8**

Minden teljes körű vizsgálatmenet tekintetében valamely vizsgálati vegyi anyag az alábbi esetben tekinthető **negatívnak**:

1. A TC_{min} meghaladja a referenciaszabvány maximális válaszának 80 %-át (REF_{80} = 20 % gátlás).

2. A vizsgálati vegyi anyag legfeljebb egy koncentrációja egyezik meg az REF_{80} értékével, vagy alacsonyabb annál.

60. Egy adott vizsgálati vegyi anyag pozitív válasza által előidézett hatás jellemzése érdekében a jelentésbe egyaránt bele kell foglalni a kiváltott hatás mértékét (agonista vizsgálatnál: TC_{max}; antagonista vizsgálatnál: TC_{min}) és a hatást előidéző koncentrációt (agonista vizsgálatnál: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonista vizsgálatnál: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

VIZSGÁLATI JELENTÉS

61. Lásd „AZ ÖSZTROGÉNRECEPTOR TRANSZAKTIVÁCIÓS VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” című 20. pontot.

SZAKIRODALOM

(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). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.

(4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P.(2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173–187.

▼**M8**

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769-771.

(10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73

(11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

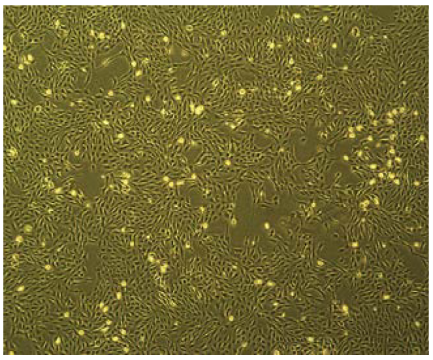
▼**M8**

4.1. függelék:

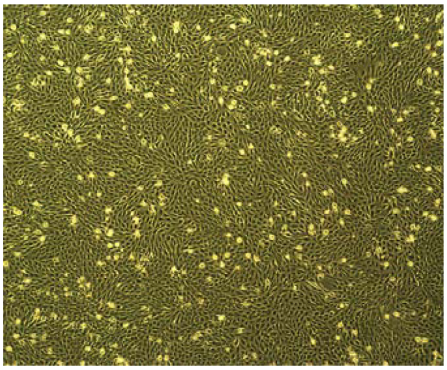
A SEJTÉLETKÉPESSÉG VIZUÁLIS MEGFIGYELÉSE



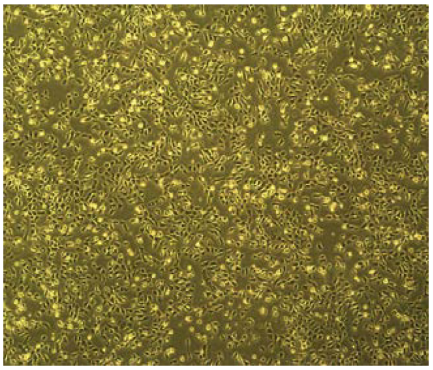
< 5 %-os konfluencia. A sejteket éppen most oltották át. 100 %-os sejtéletképesség. Osztályozás: „nincs citotoxicitás”



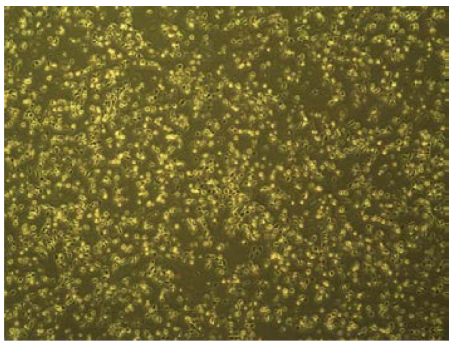
> 85 %-os konfluencia. A sejteket ebben a stádiumban kezelik a vizsgálati vegyi anyagokkal. > 95 %-os sejtéletképesség.
Osztályozás: „nincs citotoxicitás”



> 95 %-os konfluencia. A sejtek sűrűn sorakoznak egymás mellett és kezdenek túlburjánzani. > 95 %-os sejtéletképesség.
Osztályozás: „nincs citotoxicitás”



< 25 %-os sejtéletképesség. A sejtek elválnak egymástól és a közöttük lévő kontaktus csökken. A sejtek kerek formát öltenek. Osztályozás: „citotoxicitás”



< 5 %-os sejtéletképesség. A sejtek teljesen elválnak egymástól és a közöttük lévő kontaktus megszűnik. A sejtek kerek formát öltenek. Osztályozás: „citotoxicitás”

▼M8

B.67. EMLŐSSEJTEKEN TIMIDIN-KINÁZ GÉNNEL VÉGZETT *IN VITRO* GÉNMUTÁCIÓS VIZSGÁLATOK

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 490. vizsgálati iránymutatásával (2016). A vizsgálati módszereket a tudományos fejlődés, a szabályozási igények és az állatok kíméletének figyelembevételével rendszeresen felülvizsgálják és átdolgozzák. A timidin-kináz (TK) lókuszt alkalmazó egérlimfóma-vizsgálat (MLA) és TK6 vizsgálat eredetileg a B.17. vizsgálati módszer részét képezte. Később azonban a genotoxicitás vizsgálatával foglalkozó nemzetközi műhely (IWGT) MLA szakértői munkacsoportja az egérlimfóma-vizsgálat elfogadhatósági kritériumaira és adatainak értelmezésére vonatkozólag nemzetközi harmonizált ajánlásokat dolgozott ki (1) (2) (3) (4) (5), ezeket az ajánlásokat foglalja magában ez az új, B.67. vizsgálati módszer. Ez a vizsgálati módszer az egérlimfóma-vizsgálathoz készült, és mivel timidin-kináz lókuszt alkalmaz, a TK6 vizsgálatra is érvényes. Az egérlimfóma-vizsgálat ot széles körben alkalmazzák szabályozási célból, a TK6 vizsgálatot viszont sokkal ritkábban. Megjegyzendő, hogy a végpontok hasonlósága ellenére a két sejtvonal nem helyettesíthető egymással, ezért a szabályzási programok adott szabályozási célra jogosan részesítik előnyben az egyiket a másikkal szemben. Az MLA validálása például bizonyította, hogy a vizsgálat nem csupán a génmutáció észlelésére alkalmas, hanem a szerkezeti kromoszómakárosodást okozó vizsgálati vegyi anyagok kiszűrésére is. E vizsgálati módszer a genetikai toxikológiai vizsgálati módszerek sorozatának részét képezi. Az OECD kidolgozott egy, a genetikai toxikológiai vizsgálatokról tömör tájékoztatást nyújtó, az OECD genetikai toxikológiára vonatkozó vizsgálati iránymutatásainak közelmúltbeli változásait áttekintő dokumentumot (6).

2. Az emlőssejteken végzett *in vitro* génmutációs vizsgálatok célja a vegyi anyagok által előidézett génmutációk észlelése. Az ezekben a vizsgálatokban használt sejtvonalak forward (előremutató) mutációkat mérnek riportergénekben, konkrétan az endogén timidin-kináz génben (*TK* emberi sejtekben és *Tk* rágcsálók sejtekben, e vizsgálati módszer keretében együttes megnevezésük *TK*). Ezt a vizsgálati módszert két sejtvonal használatára tervezték: az egyik az L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C egérlimfóma-sejtvonal (általános nevén az L5178Y), a másik a TK6-os humán limfoblasztoid sejtvonal (elterjedt nevén a TK6). Bár a két sejtvonal eredetét, sejtnövekedését, p53 státuszát stb. tekintve különbözik egymástól, a *TK* génmutációs vizsgálatok hasonló módon végezhetők el mindkét sejttípusban, a vizsgálati módszerben leírtak szerint.

3. A timidin-kináz gén autoszomális és heterozigóta jellege lehetővé teszi, hogy a $TK^{+/-}$ > $TK^{-/-}$ mutációt követően észlelni lehessen a timidin-kináz enzimmel nem rendelkező sejtekből álló életképes telepeket. Az enzimhiányt okozhatják a TK gént érintő genetikai események, amelyek lehetnek génmutációk (pontmutációk, a leolvasási keret eltolódása, kisebb deléciók stb.) és kromoszomális események (nagy deléciók, kromoszóma-átrendeződések és mitotikus rekombináció). Ez utóbbi események a heterozigótaság elvesztését okozhatják, ami a humán tumorgenezisben szerepet játszó tumorszupresszor gének gyakori genetikai változása. Az egérlimfóma-vizsgálat elvileg képes detektálni a *TK* gént hordozó teljes kromoszóma magorsókárosodásból és/vagy mitotikus nondiszjunkcióból fakadó elvesztését. A citogenetikus és a molekuláris analízis együttes alkalmazása egyértelműen mutatja, hogy az egérlimfóma-vizsgálat timidin-kináz mutánsainak egy része nondiszjunkcióval jött létre. A bizonyítékok súlyozása azonban arra utal, hogy a TK génmutációs vizsgálatok a standard (e vizsgálati módszerben ismertetett) citotoxicitási kritériumok alkalmazásával nem képesek megbízhatóan kimutatni aneugéneket, ezért ezek a vizsgálatok aneugének észlelésére nem megfelelők (7) (8) (9).

▼**M8**

4. A TK génmutációs vizsgálatokban a timidin-kináz mutánsok két eltérő fenotípus csoportba oszthatók: a normális növekedési sebességű mutánsok, amelyek a heterozigóta timidin-kináz sejtekkel megegyező ütemben növekednek, és a lassan növő mutánsok, amelyeknek hosszabb a generációs ideje. A normális növekedési sebességű és a lassan növő mutánsokat az egérlimfóma-vizsgálatban nagy és kis telepmutánsokként, a TK6 vizsgálatban pedig gyorsan és lassan megjelenő telepmutánsokként tartják számon. Az egérlimfóma-vizsgálat nagy és kis telepmutánsainak molekuláris és citogenetikus természetét már részletesen feltárták (8) (10) (11) (12) (13). A TK6 vizsgálat gyorsan és lassan megjelenő mutánsainak molekuláris és citogenetikus természetét is széles körű vizsgálatnak vetették alá (14) (15) (16) (17). Mindkét sejttípus lassan növő mutánsait genetikus károsodás érte, amely a TK lókusz közelében elhelyezkedő, feltételezetten növekedést szabályozó gén(eke)t érinti, és amely kiváltja a megduplázódási idő elhúzódását, azaz a lassan megjelenő vagy kis telepek létrejöttét (18). A lassan növő mutánsok megjelenését alapvető szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket előidéző vegyi anyagokkal hozták összefüggésbe. Azok a sejtek, amelyeknél a mutáció nem érinti a TK lókusz közelében elhelyezkedő, feltételezhetően növekedést szabályozó gén(eke)t, a szülői sejtekhez hasonló ütemben nőnek és normális sebességgel növő mutánsokká válnak. A kezdetben normális növekedési sebességű mutánsoknál a vegyi anyagok elsődlegesen pontmutációkat okozó mutagének. Ebből következően mind a lassan növő, mind a normális növekedési sebességű mutánsokat meg kell számolni ahhoz, hogy számba vehessék az összes mutánst, és támpontokat lehessen szerezni arra nézve, hogy a vizsgálati vegyi anyag milyen típusú károsodás(oka)t idéz elő (mutagén vs. klasztogén) (10) (12) (18) (19).

5. A vizsgálati módszert úgy építették fel, hogy egyaránt biztosítson mindkét vizsgálatra (egérlimfóma-vizsgálat és TK6) érvényes általános információkat, és egyedi iránymutatást az egyes vizsgálatokhoz.

6. Az alkalmazott fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

7. Az *in vitro* végrehajtott vizsgálatok rendszerint külső forrásból származó metabolikus aktiváció alkalmazását teszik szükségessé. Az exogén metabolikus aktivációs rendszer nem utánozza teljesen az *in vivo* körülményeket.

8. Ügyelni kell arra, hogy ne álljanak elő olyan körülmények, amelyek álpozitív – tehát nem a vizsgálati vegyi anyag és a sejt genetikus anyagának kölcsönhatásából származó – eredményhez (hanem a vizsgálati rendszerrel való esetleges kölcsönhatáshoz) vezethetnének; ilyen körülmény többek között a pH-érték vagy az ozmolalitás változása, a tápfolyadék összetevőivel való kölcsönhatás (20) (21) vagy a túlzott mértékű citotoxicitás (22) (23) (24). Az egérlimfóma-vizsgálat és a TK6 vizsgálat szempontjából a 28. pontban meghatározott, ajánlott citotoxicitási felső határértékeket meghaladó citotoxicitás minősül túlzott mértékűnek. Emellett a timidin bázisanalóg, vagy timidin bázisanalógként viselkedő vizsgálati vegyi anyagok növelhetik a mutánsok gyakoriságát azáltal, hogy a sejtkezelés alatt elősegítik a spontán háttérmutánsok szelektív növekedését, így a megfelelő értékelés biztosítása érdekében további vizsgálati módszerek használatát teszik szükségessé (25).

9. A mesterséges nanoanyagok esetében e vizsgálati módszer egyedi adaptálására lehet szükség, amelyet azonban ez a vizsgálati módszer nem ismertet.

10. E vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

▼M8

11. Azok a mutáns sejtek, amelyek a $TK^{+/-}$ > $TK^{-/-}$ mutáció miatt nem mutatnak timidinkináz-enzimaktivitást, rezisztensek a pirimidin bázisanalóg trifluoro-timidin (TFT) citotoxikus hatásaival szemben. A *TK* proficiens sejtek érzékenyek a TFT-re, ami a celluláris metabolizmus gátlását okozza, és megállítja a további sejtosztódást. Így tehát a mutáns sejtek TFT jelenlétében képesek sejtburjánzásra és látható telepek létrehozására, míg a timidinkinázt tartalmazó sejtek nem képesek erre.

A VIZSGÁLAT ELVE

12. Szuszpenzióban növő sejteket megfelelő időtartamig (lásd a 33. pontot) külső forrásból származó metabolikus aktivációval és anélkül (lásd a 19. pontot) kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal, majd a sejtkultúrát átültetik, hogy meghatározzák a citotoxicitást és lehetővé tegyék a fenotípus expressziót a mutáns kiválasztása előtt. A citotoxicitást az egérlimfóma-vizsgálat esetében a relatív teljes növekedés (RTG – lásd a 25. pontot), a TK6 esetében pedig a relatív túlélés (RS – lásd a 26. pontot) alapján határozzák meg. A kezelt tenyészeteket tápoldatban tartják, az egyes sejttípusokra jellemző megfelelő ideig (lásd a 37. pontot), hogy lehetővé váljon az indukált mutációk közel optimális fenotípus expressziója. A fenotípus expressziót követően a mutációs gyakoriságot úgy határozzák meg, hogy leültetnek ismert számú sejtet a szelekciós ágenst tartalmazó tápoldatba a mutáns telepek kimutatására, valamint a szelekciós ágenst nem tartalmazó tápoldatba a kolóniaképző képesség (életképesség) meghatározására. Megfelelő inkubációs idő után megszámolják a telepeket. A mutációs gyakoriság kiszámításának alapja a mutáns telepek száma, kiigazítva a mutáns kiválasztásának idején mért kolóniaképző képességgel.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Sejtek

13. Az egérlimfóma-vizsgálat esetén: Mivel az egérlimfóma-vizsgálat kidolgozását és jellemzését az L5178Y sejtek $TK^{+/-}$ -3.7.2C alvonalára alapozták, az egérlimfóma-vizsgálathoz ezt az alvonalat kell használni. Az L5178Y sejtvonal a DBA/2 egér vonalból származó, metilkolantrénnel indukált csecsemőmirigy limfómából származik (26). Clive és munkatársai az L5178Y (Clive-féle jelöléssel $TK^{+/+}$ -3) sejteket etil-metán-szulfonáttal kezelték, majd bróm-dezoxiuridint szelekciós ágensként használva izolálták a $TK^{-/-}$ (Clive-féle jelöléssel $TK^{-/-}$ -3.7) klónt. A $TK^{-/-}$ klónból egy spontán keletkezett $TK^{+/-}$ klónt (Clive-féle jelöléssel $TK^{+/-}$ -3.7.2.) és egy alklónt (Clive-féle jelöléssel $TK^{+/-}$-3.7.2C) izoláltak és jellemeztek az egérlimfóma-vizsgálathoz (27). A sejtvonal kariotípusát közzétették (28) (29) (30) (31). Modális kromoszómaszáma 40. A sejtvonal tartalmaz egy metacentrikus kromoszómát (t12;13), amely egy kromoszómának tekintendő. Az egér timidin-kináz lókusza a 11. kromoszóma távoli végén helyezkedik el. Az L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C sejtvonal mindkét p53 allélján mutáció figyelhető meg, és mutáns p53 fehérjét hoz létre (32) (33). Valószínűleg a $TK^{+/-}$-3.7.2C sejtvonal p53 státusza felelős azért, hogy a vizsgálat képes észlelni a nagymérvű károsodásokat (17).

14. A TK6 esetében A TK6 egy humán limfoblasztoid sejtvonal. A kiinduló sejtvonal egy Epstein-Barr vírussal transzformált sejtvonal, a WI-L2, amely eredetileg egy örökletes szferocitózisban szenvedő 5 éves fiútól származik. A sejtvonal első izolált klónját, a HH4-et ICR191-gyel mutagenizálták, majd létrehozták a heterozigóta timidin-kináz sejtvonalat, a TK6-ot (34). A TK6 sejtek szinte diploid állapotúak, kromoszómakészletük jellemzői a következők: 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). A humán timidin-kináz lókusza a 17. kromoszóma hosszú karján helyezkedik el. A TK6 p53-kompetens sejtvonal, mivel mindkét allélon vad típusú p53-szekvenciával rendelkezik, és csak vad típusú p53 fehérjét fejez ki (36).

▼M8

15. Mind az egér-limfóma, mind a TK6 vizsgálatra érvényes, hogy az induló sejtkészlet létrehozása vagy lefagyasztása előtt ajánlatos a laboratóriumnak meggyőződnie a sejtek mikoplazmafertőzés-mentességéről, meghatároznia a sejtek kariotípusát vagy megfestenie azokat a kromoszómákat, amelyek a timidin-kináz lókuszt hordozzák és ellenőriznie a sejtpopuláció megduplázódási idejét. A laboratóriumban használt sejteknél meg kell állapítani a normál sejtciklus-időtartamot, és annak összhangban kell lennie a publikált jellemzőkkel (16) (19) (37). A mester törzskészletet -150 °C-on vagy az alatti hőmérsékleten kell tárolni, és minden munkakészletet ebből kell elkészíteni.

16. Nagy mennyiségű fagyasztott munkakészlet létrehozását megelőzően, vagy közvetlenül a munkakészletek kísérleti felhasználása előtt szükség lehet arra, hogy a tenyészetet megtisztítsák a jelen lévő mutáns sejtektől [kivéve, ha az oldószeres kontroll mutációs gyakorisága (MF) már az elfogadható tartományon belül van – lásd az egérlimfóma-vizsgálat 2. táblázatát)]. Ehhez metotrexáttal (aminopterinnel) szelektálják a timidinkináz-hiányos sejteket, majd timidint, hipoxantint és glicint (L5178Y) vagy 2'-deoxicitidint (TK6) adagolnak a sejtkultúrához, hogy biztosítsák a TK-kompetens sejtek (19) (38) (39) és a TK6 (40) optimális növekedését. A sejttenyészetek fenntartásához általános gyakorlati tanácsok, valamint konkrétan az L5178Y és a TK6 sejtekre vonatkozó tanácsok a (19) (31) (37) (39) (41) szakirodalmi hivatkozásban találhatók. Azoknak a laboratóriumoknak, amelyek mester törzskészletet igényelnek az egérlimfóma- vagy a TK6 vizsgálat elvégzéséhez, illetve új törzskészletet kívánnak beszerezni, rendelkezésére áll egy megfelelően jellemzett sejteket tartalmazó törzsgyűjtemény (37).

Tápfolyadék és tenyésztési körülmények

17. Mindkét vizsgálatban megfelelő tápfolyadékot és inkubációs feltételeket kell biztosítani a tenyészetek fenntartásához (pl. tenyésztőedények, 5 %-os CO_2-koncentrációjú, vízgőzzel telített levegő és 37 °C-os inkubációs hőmérséklet). A sejttenyészeteket mindig olyan körülmények között kell tartani, amelyek biztosítják az exponenciális növekedési szakaszt. Különösen fontos, hogy a tápfolyadékot és a tenyésztési körülményeket úgy válasszák meg, hogy azok biztosítsák az optimális növekedési feltételeket az expressziós időszak alatt, és mind a mutáns, mind a vad típusú sejtvonalak kolóniaképző készsége optimális legyen. Az egérlimfóma- és a TK6 vizsgálatban egyaránt fontos az is, hogy a tenyésztési körülmények biztosítsák mind a nagy telepmutánsok/gyorsan megjelenő timidin kináz mutánsok, mind a kis telepmutánsok/lassan megjelenő timidin kináz mutánsok optimális fejlődését. A sejttenyésztés további részleteiről – egyebek mellett a lószérum megfelelő iválásának szükségességéről, ha a mutánsok kiválasztása során RPMI tápfolyadékot használnak – a (19) (31) (38) (39) (40) (42) szakirodalmi hivatkozás nyújt tájékoztatást.

A tenyészetek előkészítése

18. A sejteket tárolt törzskultúrákból indítva tápfolyadékba oltják le olyan sejtszámmal, hogy a szuszpenzióban növő sejtek a teljes kezelési és expressziós időszakban exponenciálisan növekedjenek.

Metabolikus aktiválás

19. L5178Y és TK6 sejtek használata esetén exogén metabolikus aktivációs rendszereket kell alkalmazni, mivel ezek a sejtek nem rendelkeznek megfelelő endogén metabolikus képességgel. Amennyiben az ettől való eltérés nem indokolt, az alapértelmezetten ajánlott, legáltalánosabban használt rendszer a rágcsálók (általában patkányok) enziminduktorral (ilyen például az Aroclor 1254 (43) (44) (45) vagy fenobarbitál és ß-naftoflavon kombinációjával (46) (47) (48) (49) (50) (51)) kezelt májából preparált, kofaktor-kiegészítésű posztmitokondriális frakció (S9). Ez utóbbi kombináció nem ütközik a környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokról szóló stockholmi egyezménnyel (52), és kiderült róla, hogy olyan hatékony, mint az Aroclor 1254 a vegyes funkciójú oxidázok indukálásához

▼M8

(45) (46) (47) (48) (49). Az S9 frakció jellemzően 1–2 térfogatszázalék koncentrációban használatos, de a végső vizsgálati tápfolyadékban mennyisége 10 térfogatszázalékra növelhető. Az alkalmazott exogén metabolikus aktivációs rendszer vagy metabolikus induktor típusának és koncentrációjának megválasztását befolyásolhatja a vizsgálati vegyi anyagok osztálya.

A vizsgálati vegyi anyagok előkészítése

20. A szilárd halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagokat a sejtek kezelése előtt megfelelő oldószerrel elő kell kezelni, és szükség esetén hígítani kell (lásd a 21. pontot). A folyékony halmazállapotú vizsgálati vegyi anyagok közvetlenül hozzáadhatók a vizsgálati rendszerhez és/vagy hígíthatók a vizsgálati rendszer kezelése előtt. A gáz halmazállapotú vagy illékony vizsgálati vegyi anyagokat a standard protokollok megfelelő módosításával, például légmentesen lezárt tenyésztőedényekben történő kezeléssel kell vizsgálni (53) (54) (55). A vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó készítményeket közvetlenül a kezelés előtt kell előállítani, kivéve, ha a stabilitási adatok a tárolhatóságot bizonyítják.

VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEK

Oldószerek

21. Az oldószert oly módon kell kiválasztani, hogy optimális oldhatóságot biztosítson a vizsgálati vegyi anyagnak, ugyanakkor ne befolyásolja hátrányosan a vizsgálat lebonyolítását, vagyis ne változtassa meg a sejtek növekedését, ne befolyásolja a vizsgálati vegyi anyag integritását, ne lépjen reakcióba a tenyésztőedénnyel, és ne károsítsa a metabolikus aktivációs rendszert. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer (vagy tápfolyadék) használatát érdemes megfontolni. Jól bevált oldószer a víz vagy a dimetil-szulfoxid. A végleges kezelési közegben a szerves oldószerek koncentrációja általában ne haladja meg az 1 térfogatszázalékot, a vizes oldószereké (só oldat vagy víz) pedig a 10 térfogatszázalékot. A jól bevált szerves oldószerektől eltérő oldószerek (például etanol vagy aceton) használatakor a vizsgálati vegyi anyaggal és a vizsgálati rendszerrel való összeegyeztethetőségükre utaló adatokkal kell alátámasztani használatukat, és azt, hogy a használt koncentrációnál nem genotoxikusak. Alátámasztó adatok hiányában szükséges nem kezelt kontrollok alkalmazása (lásd a fogalommeghatározásokat az 1. függelékben) annak bizonyítására, hogy a kiválasztott oldószer nem vált ki káros vagy mutagén hatást.

A CITOTOXICITÁS MÉRÉSE ÉS A KEZELÉS SORÁN ALKALMAZOTT KONCENTRÁCIÓSZINTEK KIVÁLASZTÁSA

22. A vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációjának meghatározása során kerülendő az olyan koncentráció, amely hamis pozitív válaszreakciókat válthat ki, ilyen a túlzott citotoxicitást okozó koncentráció (lásd a 28. pontot), a tápfolyadékban történő kicsapódást okozó koncentráció (lásd a 29. pontot), illetve a pH vagy az ozmolalitás jelentős változását okozó koncentráció (lásd a 8. pontot). Ha a vizsgálati vegyi anyag a hozzáadásakor jelentős változást okoz a tápfolyadék pH-jában, a pH a kezelésre szolgáló végleges tápfolyadék pufferelésével kiigazítható, hogy elkerülhetők legyenek a hamis pozitív eredmények és megfelelő tenyésztési feltételeket lehessen fenntartani.

23. A koncentráció kiválasztása a citotoxicitás és egyéb megfontolások alapján történik (lásd a 27–30. pontot). Bár a fő vizsgálatban alkalmazandó koncentrációk jobb meghatározásához egy előzetes vizsgálatban érdemes meghatározni a citotoxicitást, az előzetes vizsgálat nem követelmény. Még ha sor is kerül a citotoxicitás előzetes meghatározására, a fő vizsgálat során minden kultúrára el kell végezni a citotoxicitás mérését. Amennyiben koncentráció-tartomány-behatároló kísérletet végeznek, a kísérletnek le kell fednie a koncentrációk széles körét, a kísérlet pedig lezárható a kezelést követő 1. napon, vagy folytatható a 2. napon történő expresszióig és a mutánsok kiválasztásáig (ha bebizonyosodik, hogy a használt koncentrációértékek megfelelők).

▼M8

24. A citotoxicitást minden vizsgálati és kontrollként szolgáló sejtkultúra esetében meg kell határozni: az egérlimfóma- (2) és a TK6 (15) vizsgálatban alkalmazott módszert a nemzetközileg elfogadott gyakorlat alapján dolgozták ki.

25. Az egérlimfóma-vizsgálat esetében mind az agarlemezen, mind a mikrotiterlemezen való tenyésztés során a citotoxicitást a relatív teljes növekedés (RTG) alapján kell értékelni, amelyet eredetileg Clive és Spector határozott meg 1975-ben (2). Ez a mérés magában foglalja a sejtek kezelése során tapasztalt relatív szuszpenziós növekedést (RSG: a vizsgálati kultúra összevetése az oldószeres kontrollal), az expressziós időt és a mutánsok kiválasztásának idején megfigyelt relatív kolóniaképző képességet (RCE: a vizsgálati kultúra összevetése az oldószeres kontrollal) (2). Megjegyzendő, hogy a relatív szuszpenziós növekedés számol a vizsgálati kultúrában a kezelés alatt bekövetkezett sejtpusztulással (a képletet lásd a 2. függelékben).

26. A TK6 esetében a citotoxicitást a relatív túlélés alapján kell értékelni, ami a közvetlenül a kezelést követően leültetett sejtek kolóniaképző képessége, kiigazítva a kezelés során végbement sejtpusztulással, majd a kapott sejtszám összevetve a negatív kontrollal (amelynek túlélési aránya 100 %-nak tekintendő) (a képletet lásd a 2. mellékletben).

27. Legalább négy, az elfogadhatósági kritériumokat (megfelelő citotoxicitás, sejtszám stb.) teljesítő kísérleti koncentráció eredményét kell értékelni (az oldószeres és a pozitív kontrollokon túl). Bár két párhuzamos tenyészet használata ajánlott, az egyes vizsgált koncentrációknál párhuzamos vagy szimpla kezelt tenyészetek használhatók. A párhuzamos tenyészetekben adott koncentráció mellett kapott eredményeket külön kell dokumentálni, az adatelemzéshez azonban összevonhatók (55). Az alacsony citotoxicitást vagy a citotoxicitás hiányát mutató vizsgálati vegyi anyagok esetében rendszerint megközelítőleg kétszeres-háromszoros koncentrációs intervallumok helyénvalóak. Citotoxicitás esetén olyan koncentrációkat kell választani, amelyek lefedik a 28. pontban ismertetett, citotoxicitást okozó koncentrációtól azokig a koncentrációkig terjedő tartományt, ahol mérsékelt vagy alacsony a citotoxicitás, illetve nem jelentkezik citotoxicitás. Számos vizsgálati vegyi anyagnak meredek a koncentráció-válasz görbéje, és annak érdekében, hogy a citotoxicitás teljes tartományát le lehessen fedni, vagy részletesen meg lehessen vizsgálni a koncentráció-válasz összefüggést, szükség lehet egymáshoz közelebbi koncentrációk és négynél több koncentráció használatára, különösen olyan helyzetekben, ahol megismételt kísérlet szükséges (lásd a 70. pontot). Négynél több koncentráció alkalmazásának különösen egyedi tenyészet alkalmazása esetében lehet jelentősége.

28. Ha a legnagyobb koncentráció a citotoxicitáson alapul, a legmagasabb koncentrációval 10 és 20 % közötti relatív teljes növekedést kell megcélozni az egérlimfóma-vizsgálat , és 10 és 20 % közötti relatív túlélést a TK6 vizsgálat esetén (67. pont).

29. A legalacsonyabb oldhatatlan koncentrációnál alacsonyabb koncentrációk mellett nem citotoxikus, nehezen oldható vizsgálati vegyi anyagok esetében a legmagasabb analizált koncentrációnak a vizsgálati vegyi anyaggal történő kezelés végén szemmel vagy inverz mikroszkóp segítségével látható zavarosságot vagy kicsapódást kell okoznia. Még abban az esetben is, ha citotoxicitás a legalacsonyabb oldhatatlan koncentráció felett jön létre, ajánlatos egyetlen egy, zavarosságot vagy látható kicsapódást okozó koncentrációt vizsgálni, mivel a kicsapódás fals hatásokat eredményezhet. Mivel az egérlimfóma- és a TK6 vizsgálat szuszpenzióban növő kultúrákat használ, különösen ügyelni kell annak biztosítására, hogy a kicsapódás ne zavarja a vizsgálat lebonyolítását. Hasznos lehet emellett a tápfolyadékban való oldhatóság meghatározása a kísérlet előtt.

▼M8

30. Ha nem figyelhető meg kicsapódás vagy korlátozó citotoxicitás, a legmagasabb vizsgálati koncentrációnak 10 mM-nek, 2 mg/ml-nek vagy 2 µl/ml-nek kell megfelelnie, melyek közül a legalacsonyabb a mérvadó (57) (58). Ha a vizsgálati vegyi anyag nem meghatározott összetételű, például ismeretlen vagy változó összetételű anyag, komplex reakciótermék vagy biológiai anyag [vagyis úgynevezett ismeretlen vagy változó összetételű vegyi anyag (UVCB)], környezeti extraktum stb., előfordulhat, hogy kellő citotoxicitás hiányában a legmagasabb koncentrációnak magasabbnak (például 5 mg/ml-nek) kell lennie ahhoz, hogy növekedjen az egyes összetevők koncentrációja. Megjegyzendő azonban, hogy ezek a követelmények eltérőek lehetnek a humán gyógyszerek esetében (59).

Kontrollok

31. Minden kísérleti körülménynél párhuzamos negatív kontrollokat kell használni (lásd a 21. pontot), amelyeknél csak oldószert alkalmaznak a kezelt közegben, és a kezelésük ugyanolyan módon történik, mint a kezelt tenyészeteké.

32. Párhuzamos pozitív kontrollok szükségesek annak igazolására, hogy a laboratórium képes az alkalmazott vizsgálati protokoll feltételei mellett mutagének azonosítására, hogy (adott esetben) az exogén metabolikus aktivációs rendszer eredményes, továbbá hogy megfelelően detektálhatók mind a kis telepmutánsok/lassan megjelenő TK6-mutánsok, mind a nagy telepmutánsok/gyorsan megjelenő TK6-mutánsok. Pozitív kontrollokra vonatkozó példák az alábbi 1. táblázatban találhatók. Indokolt esetben pozitív kontrollként alternatív anyagok használhatók. Mivel az emlőssejtek genetikai toxicitás szempontjából metabolikus aktiválással és anélkül végzett *in vitro* vizsgálatai a párhuzamosan lefolytatott, azonos időtartamú, rövid távú (3–4 órás) kezelések esetében kellően szabványosítottak, a pozitív kontrollok használata a metabolikus aktiválást igénylő mutagénekre korlátozódhat. Ebben az esetben egyetlen pozitív kontroll válaszreakciója a metabolikus aktiváló rendszer aktivitását és a vizsgálati rendszer reagálóképességét is bizonyítja. Hosszú távú (vagyis 24 órás, S9 nélküli) kezelés esetén azonban saját pozitív kontrollt kell végezni, mivel a kezelés időtartama eltér a metabolikus aktiválás alkalmazása mellett végzett vizsgálatétól. Mindegyik pozitív kontrollt egy vagy több olyan koncentrációban kell alkalmazni, amely a háttérértékekhez viszonyítva reprodukálható és kimutatható növekedést okoz, hogy bizonyítani lehessen a vizsgálati rendszer érzékenységét, és a választ nem veszélyeztetheti a vizsgálati módszerben meghatározott határértékeket meghaladó citotoxicitás (lásd a 28. pontot).

1. táblázat

A laboratóriumok jártasságának értékeléséhez és a pozitív kontrollok kiválasztásához ajánlott referenciaanyagok

Kategória	Anyag	CAS-szám
1. Metabolikus aktiválás nélkül is aktív mutagének		
	Metil-metánszulfonát	66-27-3
	Mitomicin-C	50-07-7
	4-Nitro-kinolin-N-oxid	56-57-5
2. Metabolikus aktiválást igénylő mutagének		
	Benzo(a)pirén	50-32-8
	Ciklofoszfamid monohidrát	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-Dimetil-benz[a]antracén	57-97-6
	3-metilkolantrén	56-49-5

▼M8

ELJÁRÁS

Kezelés a vizsgálati vegyi anyaggal

33. A proliferáló sejteket metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és hiányában kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal. Az expozíciónak megfelelő időtartamig kell tartania (ez rendszerint 3–4 óra). Megjegyzendő azonban, hogy ezek a követelmények eltérőek lehetnek a humán gyógyszerek esetében (59). Amennyiben az egérlimfóma-vizsgálatban a rövid távú kezelés negatív eredményre vezet, és léteznek a hosszabb kísérlet szükségességét alátámasztó adatok [pl. nukleozidanalógok, nehezen oldható vegyi anyagok esetében (5) (59)], fontolóra kell venni a vizsgálat hosszabb – vagyis 24 órás, S9 kiegészítők nélküli – kezeléssel járó elvégzését.

34. Az egyes vizsgálati (kontroll és kezelt) tenyészetekhez a vizsgálat bármely szakaszában alkalmazott minimális sejtszámnak a spontán mutációs gyakoriságon kell alapulnia. Az általános iránymutatás szerint minden kísérleti tenyészetben elegendő sejtet kell kezelni és passzálni ahhoz, hogy a vizsgálat minden szakaszában (kezelés, fenotípusos expresszió és mutánsok kiválasztása) előforduljon legalább 10, ideális esetben azonban 100 spontán mutáció (56).

35. Az egérlimfóma-vizsgálatban az ajánlott elfogadható spontán mutációs gyakoriság $35^{-140} \times 10^{-6}$ (agarlemezen) és $50^{-170} \times 10^{-6}$ (mikrotiterlemezen) között van (lásd a 2. táblázatot). Ahhoz, hogy minden vizsgálati sejtkultúrában legyen legalább 10, de ideális esetben 100, a kezelést túlélő spontán mutáns, legalább 6×10^6 sejt kezelése szükséges. Ilyen mennyiségű sejt kezelése, valamint a kifejeződés és a mutánsok kiválasztását lehetővé tévő kolóniaképzés során a megfelelő sejtszám fenntartása a kísérlet minden szakaszában garantálja a spontán mutánsok megfelelő számát (10 vagy több), még a 90 %-os citotoxicitást (vagyis 10 %-os relatív teljes növekedést) okozó koncentrációkkal kezelt tenyészetek esetében is (19) (38) (39).

36. A TK6 vizsgálatban a spontán mutációs gyakoriság rendszerint 2 és 10×10^{-6} közé esik. Ahhoz, hogy minden sejtkultúrában legyen legalább 10, a kezelést túlélő spontán mutáns, legalább 20×10^6 sejt kezelése szükséges. Ilyen mennyiségű sejt kezelése még a 90 %-os citotoxicitást (10 %-os relatív túlélést) kiváltó koncentrációkkal kezelt tenyészetek esetében is megfelelő számú (10 vagy több) spontán mutánst biztosít. Emellett az expressziós időszak során elegendő számú sejtet kell tenyészteni, majd kiszéleszteni a mutánsok kiválasztásához (60).

A fenotípusos expresszió ideje, valamint a citotoxicitás és a mutációs gyakoriság mérése

37. A kezelési időszak végén a sejteket meghatározott – az egyes sejtvonalakra jellemző – ideig fenntartják, hogy lehetővé tegyék az újonnan indukált mutánsok fenotípusának közel optimális expresszióját. Az egérlimfóma-vizsgálatban a fenotípusos expressziós időszak 2 nap. A TK6 vizsgálatban a fenotípusos expressziós időszak 3–4 nap. 24 órás kezelési időszak esetén az expressziós időszak a kezelés végét követően veszi kezdetét.

38. A fenotípusos expressziós időszakban a sejteket naponta megszámlálják. Az egérlimfóma-vizsgálatban a naponta mért sejtszám alapján számítják ki a napi szuszpenziós növekedést (SG). A 2 napos expressziós időszakot követően a sejteket szuszpendálják szelekciós ágenst tartalmazó, illetve szelekciós ágens nélküli tápfolyadékban, hogy meghatározzák a mutánsok számát (a szelekciós lemezeken) és a kolóniaképző képességet (az életképességet mérő lemezeken). Az egérlimfóma-vizsgálatban két egyenértékű módszer létezik a mutánsok kiválasztását célzó kolóniaképzésre: az egyik lágyagar, a másik 96 lyukú lemezbe helyezett tápfolyadék használatán alapul (19) (38) (39). A TK6 vizsgálatban a kolóniaképzés 96 lyukú lemezbe helyezett tápfolyadékban zajlik (16).

▼M8

39. A trifluor-timidin (TFT) a timidin kináz mutánsok egyetlen ajánlott szelekciós ágense (61).

40. Az egérlimfóma-vizsgálatban az agarlemezeken és a mikrotiterlemezeken 10–12 napi inkubálást követően végzik el a számlálást. A TK6 vizsgálatban a mikrotiterlemezeken fejlődő telepeken 10–14 nap elteltével számlálják meg a gyorsan megjelenő mutánsokat. A lassan növő (lassan megjelenő) TK6-mutánsok kinyeréséhez a gyorsan megjelenő mutánsok számba vételét követően a sejtekhez ismét tápfolyadékot és TFT-t kell adni, majd a lemezeket további 7–10 napon keresztül inkubálni kell (62). A lassú és normál fejlődésű timidin kináz mutánsok megszámlálására vonatkozó szempontokat lásd a 42–44. pontban.

41. A két vizsgálat, azon belül az egérlimfóma-vizsgálat két módszerének (agarlemez és mikrotiterlemez) megfelelő számlálási módját a 2. függelék tartalmazza. Az egérlimfóma-vizsgálat agarlemezes módszerénél a mutációs gyakoriság meghatározásához megszámlálják a telepeket, és a mutáns telepek számát kiigazítják a kolóniaképző képességgel. Az egérlimfóma-vizsgálat mikrotiterlemezes módszerénél és a TK6 vizsgálatnál a kolóniaképző képességet mind a mutánsok kiválasztására, mind a kolóniaképző képesség mérésére szolgáló lemezeken Poisson-elosztással állapítják meg (63). A mutációs gyakoriságot a két lemezen tapasztalt kolóniaképző készség alapján határozzák meg.

Mutáns telepek jellemzése

42. Amennyiben az egérlimfóma-vizsgálatban a vizsgálati vegyi anyag pozitív eredményt ad (lásd a 62–63. pontot), a telep méretének vagy növekedésének meghatározásával jellemezni kell a telepeket a vizsgált tenyészetek közül legalább egynél (általában a legnagyobb elfogadható pozitív koncentrációnál), valamint a negatív és a pozitív kontrolloknál. Ha a vizsgálati vegyi anyag negatívnak bizonyul (lásd a 64. pontot), a mutáns telepek jellemzését a negatív és a pozitív kontrollokon kell elvégezni. Az egérlimfóma-vizsgálat mikrotiterlemezes módszere esetén a kis telepmutánsok azok, amelyek a lyuk átmérőjének kevesebb mint 25 %-át fedik be, a nagy telepmutánsok pedig azok, amelyek a lyuk átmérőjének több mint 25 %-át fedik be. Az agarlemezes módszerben automatikus telepszámlálással határozzák meg a mutáns telepek számát és méretét. A telepméret mérésének módjairól a szakirodalom nyújt részletes tájékoztatást (19) (38) (40). A negatív és a pozitív kontrollok esetén a telepek jellemzései arra szolgálnak, hogy igazolják a vizsgálatok megfelelő végrehajtását.

43. A vizsgálati vegyi anyag nem minősíthető negatívnak, ha sem a nagy, sem a kis telepmutánsokat nem észlelik megfelelően a pozitív kontrollban. A telepek jellemzése általános tájékoztatást nyújthat arról, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes-e pontmutációkat és/vagy kromoszomális eseményeket előidézni (4. pont).

44. TK6: a normális növekedési sebességű és a lassan növő mutánsok elkülönítésének alapja az eltérő inkubációs idő (lásd a 40. pontot). A TK6 vizsgálatban általában minden tenyészetnél – így a negatív és a pozitív kontrolloknál is – számba veszik mind a gyorsan, mind a lassan megjelenő mutánsokat. A negatív és a pozitív kontroll telepjellemzései arra szolgálnak, hogy igazolják a vizsgálatok megfelelő végrehajtását. A vizsgálati vegyi anyag nem minősíthető negatívnak, ha sem a gyorsan, sem a lassan megjelenő mutánsokat nem észleli megfelelően a pozitív kontroll. A telepek jellemzése általános tájékoztatást nyújthat arról, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes-e pontmutációkat és/vagy kromoszomális eseményeket előidézni (4. pont).

▼M8

A laboratórium jártassága

45. A laboratóriumoknak a vizsgálat rutinszerű alkalmazása előtti elegendő tapasztalat igazolása érdekében kísérletsorozatot kell végrehajtaniuk referenciaként szolgáló, különböző mechanizmussal ható pozitív anyagokkal (legalább egy metabolikus aktiválással és legalább egy metabolikus aktiválás nélkül ható, az 1. táblázatban felsoroltak közül kiválasztott anyaggal), és különböző negatív kontrollokkal (nem kezelt tenyészetek és különféle oldószerek/vivőanyagok használatával). E pozitív és negatív kontrollok válaszreakcióinak összhangban kell lenniük a szakirodalommal. Ez nem vonatkozik azokra a laboratóriumokra, amelyek tapasztalattal rendelkeznek, azaz amelyeknek a rendelkezésére áll a 47–50. pontban meghatározott, dokumentált adatbázis. Az egérlimfóma-vizsgálatban a pozitív és a negatív kontrollból nyert adatoknak összhangban kell lenniük a genotoxicitás vizsgálatával foglalkozó nemzetközi műhely ajánlásaival (lásd a 2. táblázatot).

46. A pozitív kontrollként kiválasztott anyagokat (lásd az 1. táblázatot) meg kell vizsgálni metabolikus aktiválás nélkül rövid és hosszú kezelési idővel (ha végeznek hosszú időtartalmú kezelést) és metabolikus aktiválást alkalmazó rövid kezelési idővel is, a laboratórium mutagén hatású vegyi anyagok kimutatásában és a metabolikus aktivációs rendszer hatékonyságának meghatározásában való jártasságának bizonyítására, valamint be kell mutatni, hogy a laboratórium megfelelően végzi a kezelés alatt a sejttenyésztést, a fenotípusos expressziót és a mutánsok kiválasztását, továbbá, hogy a kiértékelési eljárások is megfelelőek. A vizsgálati rendszer érzékenységének és dinamikus tartományának bizonyítása érdekében a kiválasztott anyagok koncentrációtartományát úgy kell megválasztani, hogy reprodukálható és koncentrációval összefüggő növekedést biztosítson a háttérértékekhez viszonyítva.

Történeti kontrolladatok

47. A laboratóriumnak meg kell állapítania a következőket:

— a pozitív történeti kontrollok tartománya és eloszlása,

— a negatív (nem kezelt, oldószeres) történeti kontrollok tartománya és eloszlása.

48. A negatív történeti kontrollok dokumentált eloszlásához kapcsolódó első adatgyűjtés során a párhuzamos negatív kontrolloknak összhangban kell lenniük a negatív kontrollokra vonatkozóan közzétett adatokkal. Amint több kísérleti adat adódik a kontrollok eloszlásához, a párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben az eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük (64) (65).

49. A laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisát első lépésként legalább 10 kísérlettel kell kiépíteni, de az adatbázisnak lehetőség szerint legalább 20, összehasonlítható kísérleti körülmények között végzett kísérletet kell tartalmaznia. A laboratóriumoknak minőségellenőrzési módszereket, például ellenőrzési diagramokat (C-diagramokat vagy X-bar diagramokat (65)) kell alkalmazniuk annak meghatározására, hogy a pozitív és a negatív kontrollokra vonatkozó adataik mennyire változóak, valamint annak bizonyítására, hogy náluk a módszertan „ellenőrzés alatt” áll (66). A dokumentált adatok gyűjtésére és használatára vonatkozó további részletek és ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (64).

50. A negatív kontrollokra vonatkozó adatoknak tartalmazniuk kell a szimpla tenyészetből vagy lehetőség szerint a párhuzamos tenyészetekből származó mutációs gyakoriságot, ahogyan az a 27. pontban szerepel. A párhuzamos negatív kontrolloknak ideális esetben a laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisa szerinti eloszlás 95 %-os ellenőrzési határértékén belül kell lenniük. Amennyiben a negatív kontrollokra vonatkozó adatok a 95 %-os ellenőrzési határértéken kívül esnek, akkor számíthatók be a kontrollok dokumentált eloszlásába, ha ezek az adatok nem szélsőségesen kiugró értékek, továbbá bizonyíték van arra, hogy a vizsgálati rendszer „ellenőrzés alatt áll” (lásd a 49. pontot), valamint arra, hogy nem áll fenn szakmai vagy emberi mulasztás.

▼M8

51. A kísérleti protokoll bármely módosítását meg kell vizsgálni abból a szempontból, hogy az adatok összhangban vannak-e a laboratórium meglévő történeti kontrolladatbázisaival. Jelentősebb következetlenségek fennállása esetén új történeti kontrolladatbázist kell létrehozni.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az eredmények értékelése

52. Az adatok ismertetésének az egérlimfóma és a TK6 vizsgálat esetében is ki kell terjednie a kezelt és a kontrollként szolgáló tenyészetekre, a citotoxicitás (relatív teljes növekedés vagy relatív túlélés) kiszámításához szükséges adatokra és a mutációs gyakoriságra, az alábbiakban meghatározottak szerint.

53. Az egérlimfóma-vizsgálatban az egyes tenyészetekre vonatkozólag meg kell adni a relatív szuszpenziós növekedést, a relatív teljes növekedést, a mutánsok kiválasztásának idején mért kolóniaképző képességet és a mutáns telepek számát (agarlemez használata esetén), illetve az üres lyukak számát (mikrotiterlemez használata esetén). A mutációs gyakoriságot a mutáns sejtek száma és 1 millió túlélő sejt hányadosaként kell kifejezni. Pozitív válasz esetén meg kell adni a kis és a nagy telepek mutációs gyakoriságát (és/vagy a teljes mutációs gyakoriság arányát) a vizsgálati vegyi anyag legalább egy koncentrációjánál (általában a legnagyobb pozitív koncentrációnál), valamint a negatív és a pozitív kontrolloknál. Negatív válasz esetén a negatív és a pozitív kontroll kis és nagy telepeinek mutációs gyakoriságát kell megadni.

54. A TK6 vizsgálatban az egyes tenyészetekre vonatkozólag meg kell adni a relatív túlélést, a mutánsok kiválasztásának idején mért kolóniaképző képességet, valamint a gyorsan és a lassan megjelenő mutánsoknál megfigyelt üres lyukak számát. A mutációs gyakoriságot a mutáns sejtek számának és a túlélő sejtek számának hányadosaként kell meghatározni, továbbá meg kell adni a teljes mutációs gyakoriságot, valamint a gyorsan és a lassan megjelenő mutánsok mutációs gyakoriságát (és/vagy a teljes mutációs gyakoriság arányát).

Elfogadhatósági kritériumok

55. Egy adott vizsgálati vegyi anyag összesített eredményeinek meghatározása előtt mind az egérlimfóma, mind a TK6 vizsgálatban teljesíteni kell az alábbi kritériumokat:

— Két kísérleti körülmény (rövid időtartamú kezelés metabolikus aktiválással és metabolikus aktiválás nélkül – lásd a 33. pontot) vizsgálatára került sor, kivéve, ha az egyik pozitív eredményeket hozott.

— Megfelelő számú sejt és koncentrációérték elemezhető (lásd a 27. és a 34–36. pontot).

— A legmagasabb koncentráció kiválasztására vonatkozó kritériumok összhangban vannak a 28–30. pontban ismertetett legmagasabb koncentrációkkal.

Negatív és pozitív kontrollok elfogadhatósági kritériumai

56. Miután az IWGT mlA szakértői munkacsoportja az egérlimfóma-vizsgálat ból származó adatok széles körét elemezte, nemzetközi konszenzus jött létre az egérlimfóma-vizsgálat ra vonatkozó konkrét elfogadhatósági kritériumokról (1) (2) (3) (4) (5). Ezért ez a vizsgálati módszer konkrét ajánlásokat fogalmaz meg a negatív és a pozitív kontrollok elfogadhatóságára, valamint az egérlimfóma-vizsgálatban tesztelt anyagok eredményeinek kiértékelésére vonatkozólag. A TK6 vizsgálat jelentősen kisebb adatbázissal rendelkezik, amelyet nem értékelt munkacsoport.

▼M8

57. Az egérlimfóma-vizsgálat minden kísérletét értékelni kell abból a szempontból, hogy a kezeletlen/oldószeres kontroll teljesíti-e az IWGT mlA munkacsoportja által felállított elfogadhatósági kritériumokat ((4) és az alábbi 2. táblázat) a következő mutatók tekintetében: (1) mutációs gyakoriság (az IWGT eltérő mutációs gyakoriságot minősített elfogadhatónak az egérlimfóma-vizsgálat agarlemezes és mikrotiterlemezes vizsgálatánál), (2) a mutánsok kiválasztásának idején mért kolóniaképző képesség (CE) és (3) az oldószeres kontroll során tapasztalt szuszpenziós növekedés (SG) (a képleteket lásd a 2. függelékben).

2. táblázat

Az egérlimfóma-vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

Paraméter	Lágyagar módszer	Mikrotiter módszer
Mutációs gyakoriság	35–140 × 10^{-6}	50–170 × 10^{-6}
Kolóniaképző képesség	65–120 %	65–120 %
Szuszpenziós növekedés	8–32-szeres (3–4 órás kezelés) 32–180-szoros (24 órás kezelés, ha végeztek ilyet)	8–32-szeres (3–4 órás kezelés) 32–180-szoros (24 órás kezelés, ha végeztek ilyet)

58. Az egérlimfóma-vizsgálatban minden kísérletet értékelni kell abból a szempontból is, hogy a pozitív kontroll(ok) teljesíti(k)-e az IWGT munkacsoport által kidolgozott két alábbi elfogadhatósági kritérium legalább egyikét:

— A pozitív kontrollnak elő kell idéznie a teljes mutációs gyakoriság abszolút növekedését, vagyis a spontán háttér mutációs gyakoriságot legalább 300 × 10^{-6} mértékben meghaladó növekedést kell kiváltania [indukált MF (IMF)]. A kis kolóniáknál megfigyelt mutációs gyakoriságnak legalább 40 %-ban indukált mutációs gyakoriságnak kell lennie.

— A pozitív kontrollnál a kis kolóniák mutációs gyakorisága legalább 150 × 10^{-6} mértékben haladja meg a párhuzamos kezeletlen/oldószeres kontrollnál tapasztalt mutációs gyakoriságot (azaz a kis kolóniák indukált mutációs gyakorisága 150 × 10^{-6}).

59. A TK6 vizsgálatban akkor elfogadhatók a kísérletek, amikor a párhuzamos negatív kontroll a 48–49. pont szerint belefoglalható a laboratórium negatív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisába. Ezenfelül a párhuzamos pozitív kontrolloknak (lásd a 32. pontot) a pozitív történeti kontrollokat tartalmazó adatbázisban generált válaszokkal összeegyeztethető válaszreakciókat, valamint a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva statisztikailag szignifikáns növekedést kell előidézniük.

60. Mindkét vizsgálat esetében a pozitív kontrolltenyészetnél megfigyelt citotoxicitás felső határának meg kell egyeznie a vizsgált kultúráknál tapasztalt citotoxicitás felső határával. Ez azt jelenti, hogy a relatív teljes növekedés/relatív túlélés nem csökkenhet 10 % alá. Elegendő egyetlen koncentrációt (több koncentrációérték használata esetén a pozitív kontrolltenyészetek egyik koncentrációját) vizsgálni annak igazolására, hogy a pozitív kontroll elfogadhatósági kritériumai teljesülnek. Emellett szükséges az is, hogy a pozitív kontroll mutációs gyakorisága a laboratórium által meghatározott elfogadhatósági tartományon belül legyen.

Az eredmények értékelése és értelmezése

61. Az IWGT egérlimfóma szakértői munkacsoportja jelentős munka keretében megállapította az egérlimfóma-vizsgálat pozitív válaszának biológiai relevanciáját és kritériumait (4). Ezért ez a vizsgálati módszer konkrét ajánlásokat fogalmaz meg az egérlimfóma-vizsgálatban tesztelt vizsgálati vegyi anyagok

▼M8

eredményeinek kiértékelésére vonatkozólag (lásd a 62–64. pontot). A TK6 vizsgálat jelentősen kisebb adatbázissal rendelkezik, amelyet nem értékelt munkacsoport. Ebből adódóan a TK6 vizsgálatból származó adatok értelmezésére vonatkozó ajánlások általánosabban fogalmaznak (lásd a 65–66. pontot). Mindkét vizsgálatra nézve megfogalmaztak kiegészítő ajánlásokat (lásd a 67–71. pontot).

EGÉRLIMFÓMA-VIZSGÁLAT

62. Ajánlatos egységes megközelítést alkalmazni a pozitív és negatív válaszok meghatározására, mert ez biztosítja a megnövekedett mutációs gyakoriság biológiai relevanciáját. A más vizsgálatoknál általánosan alkalmazott statisztikai elemzés helyett az egérlimfóma-vizsgálat egy előre meghatározott indukált mutációs gyakoriságot (vagyis a mutációs gyakoriság párhuzamos kontrollal összevetett növekedését) veszi alapul, az úgynevezett globális értékelési faktort (GEF), amely a részt vevő laboratóriumok által elvégzett negatív kontrollokból nyert mutációs gyakorisági adatok eloszlásának elemzése alapján került meghatározásra (4). A GEF az egérlimfóma-vizsgálat agarlemezes változata esetén 90×10^{-6}, mikrotiterlemezes változata esetén pedig 126×10^{-6}.

63. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha a vizsgált kísérleti körülmények bármelyikében (lásd a 33. pontot) a mutációs gyakoriság párhuzamos háttérértékhez viszonyított növekedése meghaladja a GEF-et, és a növekedés (pl. egy trendpróbával) koncentrációfüggést mutat. Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes mutációt előidézni ebben a vizsgálati rendszerben.

64. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha a vizsgált kísérleti körülmények (lásd a 33. pontot) egyikében sem figyeltek meg koncentrációfüggő választ, illetve ha növekedett is a mutációs gyakoriság, a növekedés mértéke nem haladja meg a GEF-et. Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag ebben a vizsgálati rendszerben nem képes mutációt előidézni.

TK6

65. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen pozitívnak minősül, ha a vizsgált kísérleti körülmények bármelyikében (lásd a 33. pontot):

— legalább az egyik vizsgálati koncentráció statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,

— a megfelelő trendpróbával történő értékelés arra utal, hogy a növekedés koncentrációfüggő (lásd a 33. pontot),

— ezen eredmények bármelyike a negatív történeti kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) kívül esik; lásd a 48. pontot).

Mindezen kritériumok teljesülése esetén úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag képes mutációt előidézni ebben a vizsgálati rendszerben. A legmegfelelőbb statisztikai módszerekre vonatkozó ajánlások megtalálhatók a szakirodalomban (66) (67).

66. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag egyértelműen negatívnak minősül, ha valamennyi vizsgált kísérleti körülmény mellett (lásd a 33. pontot):

— a vizsgálati koncentrációk egyike sem mutat statisztikailag szignifikáns növekedést a párhuzamos negatív kontrollhoz viszonyítva,

— a megfelelő trendpróbával végzett értékelés nem mutat koncentrációfüggő növekedést,

▼M8

— valamennyi eredmény a negatív történeti kontrolladatok eloszlásán (például Poisson-eloszlású 95 %-os ellenőrzési határértéken) belül van; lásd a 48. pontot).

Ezt követően úgy tekintendő, hogy a vizsgálati vegyi anyag ebben a vizsgálati rendszerben nem képes mutációt előidézni.

Az egérlimfóma- és a TK6 vizsgálatra egyaránt vonatkozó szempontok:

67. Ha a legnagyobb koncentráció a citotoxicitáson alapul, a legmagasabb koncentrációval 10 és 20 % közötti relatív teljes növekedést/relatív túlélést kell megcélozni. Megegyezés szerint körültekintően kell eljárni a 10 és 20 % közötti relatív teljes növekedésnél/relatív túlélésnél jelentkező pozitív eredmények értékelése során, és az eredmények nem tekinthetők pozitívnak, ha a mutációs gyakoriság növekedése csak 10 %-os vagy az alatti relatív teljes növekedésnél/relatív túlélésnél tapasztalható (ha ez értékelt) (2) (59).

68. Bizonyos körülmények között további információk segítséget nyújthatnak egy adott vizsgálati vegyi anyag nem mutagén jellegének meghatározásához, amikor egyik tenyészetnél sem mutatható ki 10–20 %-os relatív teljes növekedés/relatív túlélés közé eső relatív teljes növekedés. Az alábbi helyzetek tartoznak ide: (1) A 100 % és 20 % közötti relatív teljes növekedési/relatív túlélési tartományba eső adatpontoknál nincsenek mutagenitásra utaló jelek (pl. nincs dózisfüggő válasz, a mutációs gyakoriság nem haladja meg a párhuzamos negatív kontrollét vagy a dokumentált háttérérték-tartományt stb.), és legalább egy adatpont a 20 % és 25 % közötti relatív teljes növekedési/relatív túlélési tartományba esik. (2) A 100 % és 25 % közötti relatív teljes növekedési/relatív túlélési tartományba eső adatpontoknál nincsenek mutagenitásra utaló jelek (pl. nincs dózisfüggő válasz, a mutációs gyakoriság nem haladja meg a párhuzamos negatív kontrollét vagy a dokumentált háttérérték-tartományt stb.), és egy negatív adatpont kissé a 10 %-os relatív teljes növekedés/relatív túlélés alatt helyezkedik el. A vizsgálati vegyi anyag mindkét helyzetben negatívnak minősíthető.

69. Az egyértelműen pozitív vagy negatív válasz igazolása nem követelmény.

70. Olyan esetekben, amikor a válaszreakció – a fentiekben leírtak szerint – nem egyértelműen negatív vagy pozitív, illetve egy adott eredmény biológiai relevanciája megállapításának alátámasztása érdekében az adatokat szakértői vélemény és/vagy további vizsgálatok alapján kell értékelni. Hasznos lehet egy megismételt kísérlet lehetőleg módosított kísérleti körülmények melletti elvégzése [pl. a koncentrációk felosztásának módosításával megnövelni a valószínűségét annak, hogy az adatpontok a 10–20 %-os relatív teljes növekedési/relatív túlélési tartományba esnek, más metabolikus aktiválási feltételek (S9 koncentrációjának vagy forrásának megváltoztatása) vagy más kezelési időtartam alkalmazása).

71. Ritka esetekben az adatkészlet – még további vizsgálatok után is – eleve kizárja a pozitív vagy negatív eredményekre vonatkozó következtetést. Ezért a vizsgálati vegyi anyag válaszreakcióját kétértelműnek kell minősíteni (amit úgy kell értelmezni, hogy egyenlő valószínűséggel tekinthető pozitívnak és negatívnak).

VIZSGÁLATI JELENTÉS

72. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

— eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;

▼M8

— adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén jellemezve.

Oldószer:

— az oldószer kiválasztásának indokolása;

— az oldószernek a végleges tápfolyadékon belüli aránya.

Sejtek:

Laboratóriumi törzstenyészetek esetén:

— a sejtek típusa és eredete, valamint a vizsgálólaboratóriumban rendelkezésre álló dokumentált adataik;

— kariotípus jellemzői és/vagy modális kromoszómaszám;

— a sejttenyészetek fenntartásának módszerei.

— a mikoplazmamentesség;

— sejt megduplázódási ideje.

Vizsgálati körülmények:

— a koncentrációk kiválasztásának és a sejttenyészetek számának indokolása; beleértve például a citotoxicitási adatokat és az oldhatóságra vonatkozó korlátokat;

— a közeg összetétele, CO_2-koncentráció, páratartalom;

— a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja a tápfolyadékon belüli végső koncentrációjaként kifejezve (például µg vagy mg/a tápfolyadék ml-e vagy mM-ja);

— a tápfolyadékhoz adott oldószer és vizsgálati vegyi anyag koncentrációja (és/vagy térfogata);

— inkubációs hőmérséklet;

— inkubációs idő;

— a kezelés időtartama;

— sejtsűrűség a kezelés időtartama alatt;

▼**M8**

— a metabolikus aktivációs rendszer típusa és összetétele (az S9 eredete, az S9 keverék elkészítési módszerei, az S9 keverék és az S9 koncentrációja vagy térfogata a végleges tápfolyadékban, az S9 minőségellenőrzése);

— pozitív és negatív kontrollként szolgáló anyagok, végső koncentráció az egyes kezelési körülmények esetén;

— az expressziós időszak hossza (beleértve a leültetett sejtek számát, a szubkultúrákat és a tápfolyadékok cseréjét, ha szükséges);

— a szelekciós ágens neve és koncentrációja;

— egérlimfóma-vizsgálat esetén jelezni kell az alkalmazott vizsgálat típusát (agarlemezes vagy mikrotiterlemezes);

— a vizsgálatok elfogadhatóságának kritériumai;

— az életképes és mutáns sejtek számának megállapítására használt módszerek;

— a citotoxicitás mérésére alkalmazott módszerek;

— a citotoxicitás és az alkalmazott módszer szempontjából lényeges kiegészítő információk;

— a leültetést követően végzett inkubálás időtartama;

— azon telepek meghatározása, amelyek méretét és típusát figyelembe vették (beleértve a „kis” és „nagy” telepekre vonatkozó kritériumokat is);

— azok a kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e;

— adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás meghatározására alkalmazott módszerek.

Eredmények:

— az egyes tenyészetek esetében kezelt sejtek és átültetett sejtek száma;

— citotoxicitási paraméterek (egérlimfóma-vizsgálat esetében a relatív teljes növekedés, a TK6 esetében a relatív túlélés);

— a kicsapódás jelei és a meghatározás időpontja;

— a szelektív és nem szelektív folyadékba leültetett sejtek száma;

— a telepek száma a nem szelektív közegben és a rezisztens telepek száma a szelektív közegben, valamint az ezeknél tapasztalható mutációs gyakoriság;

— a negatív és pozitív kontrollok telepeinek mérete, és ha a vizsgálati vegyi anyag pozitív, legalább egy koncentráció és a hozzá kapcsolódó mutációs gyakoriság;

— amennyiben lehetséges, a koncentráció-válasz összefüggés;

— a párhuzamos negatív (oldószeres) és pozitív kontrollokra vonatkozó adatok (koncentrációk és oldószerek);

— történeti negatív (oldószeres) és pozitív kontroll adatok (koncentrációk és oldószerek), tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel; a dokumentált kontrolladatok alapjául szolgáló vizsgálatok száma;

▼M8

— statisztikai elemzések (az egyes tenyészetek és adott esetben összevont párhuzamos tenyészetek tekintetében), valamint p-értékek, ha meghatározásra kerültek; és az egérlimfóma-vizsgálat esetében a GEF értékelése.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(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, Párizs.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

▼**M8**

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

▼**M8**

(24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: 147-204.

(25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411-416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

▼**M8**

(37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

(38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

(43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.

(44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

(47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol*. *Toxicol*., 4 (1): 55-65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

▼**M8**

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

(53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91-103.

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Elérhető a következő címen:[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.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼M8

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Aneugén: olyan vegyi anyag vagy folyamat, amely a mitózissal vagy meiózissal történő sejtosztódási ciklus elemeivel kölcsönhatásba lépve a sejtek vagy organizmusok aneuploidiáját eredményezi.

Aneuploidia: a normális diploid (vagy haploid) kromoszómaszámtól egyetlen kromoszómával vagy egynél több, szám feletti kromoszómával, de nem teljes kromoszómakészlettel (kromoszómakészletekkel) (poliploidia) való bármely eltérés.

Báziscserét okozó mutagének: azok a vegyi anyagok, amelyek a bázispárok szubsztitúcióját okozzák a DNS-ben.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Kolóniaképző képesség: azon alacsony sűrűséggel leültetett sejtek százalékaránya, amelyek képesek megszámolható teleppé fejlődni.

Klasztogén: bármely olyan vegyi anyag vagy folyamat, amely sejtek vagy szervezetek populációjában szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket okoz.

Citotoxicitás: az e vizsgálati módszerbe tartozó vizsgálatok esetében a citotoxicitás az egérlimfóma-vizsgálat esetében a relatív teljes növekedés (RTG), a TK6 vizsgálat esetében a relatív túlélés (RS) csökkenését jelenti.

Forward (előremutató) mutáció: a mutáns alak szülőktől származó típusától eltérő olyan génmutáció, amely a kódolt protein enzimaktivitásának vagy funkciójának változását vagy elvesztését eredményezi.

Frameshiftet okozó mutagének: azok a vegyi anyagok, amelyek egy vagy több bázispár addícióját vagy delícióját okozzák a DNS-ben.

Genotoxikus: általános kifejezés, amely magába foglalja a DNS- vagy kromoszómakárosodás valamennyi típusát, köztük a DNS-töréseket, adduktok képződését, átrendeződéseket, mutációkat, kromoszómaaberrációkat és aneuploidiát. A genotoxikus hatások nem minden típusa eredményez mutációkat vagy stabil kromoszómakárosodást.

Mitotikus rekombináció: a mitózis során a homológ kromatidok rekombinációja, ami kettős szálú DNS-töréseket vagy a heterozigótaság elvesztését okozhatja.

Mutagén: örökletes elváltozást idéz elő a génekben lévő DNS-bázispár-szekvencia(k)ban vagy a kromoszómák szerkezetében (kromoszómaaberrációk).

Mutációs gyakoriság: a megfigyelt mutáns sejtek száma elosztva az életképes sejtek számával.

Fenotípusos expresszió ideje: a kezelést követő időtartam, amely során a genetikai változás rögzül a genomban, és a korábban meglévő géntermékek olyan mértékben kiürülnek, hogy a fenotípus-tulajdonság megváltozik.

Relatív túlélés: A relatív túlélést a kezelés okozta citotoxicitás mutatójaként használják a TK6 vizsgálatban. A relatív túlélés a közvetlenül a sejtkezelést követően leültetett sejtek relatív kolóniaképző képessége (CE) kiigazítva a kezelés során a sejtszámban bekövetkezett veszteséggel, és összevetve a negatív kontroll kolóniaképző képességével.

▼M8

Relatív szuszpenziós növekedés (RSG): Az egérlimfóma-vizsgálatban a vizsgált sejtkultúra relatív teljes kétnapos szuszpenziós növekedése összevetve a negatív/oldószeres kontroll teljes kétnapos szuszpenziós növekedésével (Clive and Spector, 1975). A relatív szuszpenziós növekedésnek magában kell foglalnia a vizsgált kultúra által a kezelési időszakban a negatív/oldószeres kontrollhoz viszonyítva elért relatív növekedést.

Relatív teljes növekedés (RTG): Az egérlimfóma-vizsgálat esetében a relatív teljes növekedést a kezelés okozta citotoxicitás mutatójaként használják. A relatív teljes növekedés a vizsgált kultúrák relatív (a vivőanyagos kontrollhoz viszonyított) növekedését méri a vizsgálat kezelési, kétnapos kifejeződési és a mutánsok kiválasztására szolgáló kolóniaképzési szakaszában. Az egyes vizsgált kultúrák relatív teljes növekedését megszorozzák a vizsgált kultúra mutánsok kiválasztásának idején mért relatív kolóniaképző képességével, és a negatív/oldószeres kontroll kolóniaképző képességének arányában fejezik ki (Clive and Spector, 1975).

S9 májfrakciók: 9 000 g centrifugálás utáni májhomogenátum felülúszója, azaz a nyers májextraktum.

S9 keverék: az S9 májfrakció és a metabolikus enzimaktivitáshoz szükséges kofaktorok keveréke.

Szuszpenziós növekedés: A sejtek számának növekedési faktora az egérlimfóma-vizsgálat kezelési és kifejeződési szakaszában. A szuszpenziós növekedés meghatározásához rövid idejű (3–4 órás) kezelésnél megszorozzák az 1. napon tapasztalt növekedési faktort a 2. napon észlelt növekedési faktorral. 24 órás kezelés alkalmazása esetén a szuszpenziós növekedés a 24 órás kezelés során mért növekedési faktor és az 1. és 2. expressziós napon mért növekedési faktorok szorzata.

Oldószeres kontroll: a csak a vizsgálati vegyi anyag feloldására használatos oldószert tartalmazó kontrolltenyészetek meghatározására szolgáló általános kifejezés.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Nem kezelt kontrollok: nem kezelt (azaz sem a vizsgálati vegyi anyaggal, sem oldószerrel nem kezelt), de a vizsgálati vegyi anyagot befogadó tenyészetekkel azonos módon feldolgozott tenyészetek.

▼M8

2. függelék

KÉPLETEK

Citotoxicitás

Az egérlimfóma-vizsgálat mindkét (agarlemezes és mikrotiterlemezes) változatánál

A citotoxicitást a relatív teljes növekedés (RTG) alapján határozzák meg, amely magában foglalja a kétnapos expressziós időszak során elért relatív szuszpenziós növekedést (RSG) és a mutánsok kiválasztásának idején meghatározott relatív kolóniaképző képességet (RCE). Az RTG, az RSG és az RCE értékét százalékos arányszámként fejezik ki.

A relatív szuszpenziós növekedés (RSG) kiszámítása: Az 1. szuszpenziós növekedés (SG_1) az 1. napon a 0. naphoz képest megfigyelt növekedési sebesség (1. napi sejtkoncentráció/0. napi sejtkoncentráció), a 2. szuszpenziós növekedés (SG_2) pedig a 2. napon az 1. naphoz képest tapasztalt növekedési sebesség (2. napi sejtkoncentráció/1. napi sejtkoncentráció). Az RSG a kezelt kultúra teljes szuszpenziós növekedése ($SG_1 \times SG_2$) a kezeletlen/oldószeres kontrollhoz viszonyítva. Azaz: $RSG = [SG_{1(vizsgált)} \times SG_{2(vizsgált)}] / [SG_{1(kontroll)} \times SG_{2(kontroll)}]$ Az SG_1 értékét a sejtkezelés kezdetén használt induló sejtkoncentráció alapján kell meghatározni. Ezzel megállapíthatók a vizsgált kultúrá(k)ban a sejtkezelés során a citotoxicitás terén bekövetkezett változások.

Az RCE a vizsgált kultúra relatív kolóniaképző képességének és a kezeletlen/oldószeres kontroll relatív kolóniaképző képességének aránya, amelyet a mutánsok kiválasztásának időpontjában határoznak meg.

Relatív teljes növekedés (RTG): $RTG=RSG \times RCE$

TK6

Relatív túlélés (RS):

A citotoxicitást a relatív túlélés alapján értékelik, ami a közvetlenül a kezelést követően leültetett sejtek kolóniaképző képessége (CE), kiigazítva a kezelés során a sejtszámban bekövetkezett veszteséggel, és összevetve a negatív kontrollok (túlélési arányuk 100 %-nak tekintendő) kolóniaképző képességével. A kezelés során végbement sejtpusztulás miatt szükséges kiigazítás az alábbi módon számítható ki:

$$\text{Kiigazított CE} = \text{CE} \times \frac{\textit{A sejtek száma a kezelés kezdetén}}{\textit{A sejtek száma a kezelés végén}}$$

A vizsgálati vegyi anyaggal kezelt tenyészetek relatív túlélése az alábbi módon határozható meg:

$$\textit{Relatív túlélés} = \frac{\textit{Kiigazított kolóniaképző készség kezelt tenyészetben}}{\textit{Kiigazított kolóniaképző készség oldószeres kontrollban}} \times 100$$

Mutációs gyakoriság az egérlimfóma- és a TK6 vizsgálat esetében

A mutációs gyakoriság (MF) a szelektív közegben növő mutáns telepek kolóniaképző képességének (CE_M) és a nem szelektív közegben fejlődő telepek kolóniaképző képességének (CE_V) aránya, amelyet a mutánsok kiválasztásának időpontjában határoznak meg. Azaz: $MF=CE_M/CE_V$. E két kolóniaképző készséget az agarlemezes és a mikrotiterlemezes kolóniaképző módszer esetén az alábbiakban leírtak szerint kell meghatározni.

▼**M8**

***Az egérlimfóma-vizsgálat agarlemezes változata*:** Az egérlimfóma-vizsgálat lágyagarlemezes változatában a szelekciós lemezen lévő telepek száma (C_M) és a nem szelekciós, vagyis a kolóniaképző képesség (életképesség) meghatározására szolgáló lemezen lévő telepek száma (C_V) a kolóniák közvetlen megszámlálásával állapítható meg. Amikor 600 sejtet ültetnek le a szelekciós lemezek (C_M) és a nem szelekciós, vagyis a kolóniaképző képesség (életképesség) meghatározására szolgáló lemezek (C_V) kolóniaképző képességének (CE) meghatározásához, és 3×10^6 sejtet használnak a mutánsok kiválasztására, akkor:

$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$

$CE_V = C_V / 600$

Mikrotiterlemezes egérlimfóma- és a TK6 vizsgálat: Az egérlimfóma-vizsgálat mikrotiterlemezes változatában a C_M és a C_V értékét a mikrotiterlemezek teljes lyukszámának (TW) és a lyukankénti telepek feltételezhető számának (P) szorzataként határozzák meg.

$C_M = P_M \times TW_M$

$C_V = P_V \times TW_V$

A Poisson-elosztás nulla valószínűségi változójából kiindulva (Furth és munkatársai, 1981) a P-t a következő módon kapjuk meg:

$P = - \ln (EW / TW)$

Ahol az EW az üres lyukak, a TW pedig az összes lyuk száma. Ebből következően:

$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$

$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$

Az egérlimfóma-vizsgálat mikrotiterlemezes változatában a kis és nagy telepek mutációs gyakoriságát azonos módon határozzák meg, a kis és nagy telepek üres lyukainak száma alapján.

A TK6 vizsgálatban a kis és nagy telepek mutációs gyakoriságát a gyorsan és a lassan megjelenő mutánsok száma alapján állapítják meg.

▼M8

B.68. **RÖVID EXPOZÍCIÓS IDEJŰ IN VITRO VIZSGÁLATI MÓDSZER i. A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁST OKOZÓ VEGYI ANYAGOK ÉS ii. A SZEMIRRITÁCIÓ VAGY A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁS TEKINTETÉBEN BESOROLÁST NEM IGÉNYLŐ VEGYI ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA**

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 491. vizsgálati iránymutatásában (2017) leírt módszerrel. A rövid expozíciós idejű (STE) vizsgálati módszer egy *in vitro* eljárás, amely bizonyos helyzetekben és meghatározott korlátok mellett alkalmazható a súlyos szemkárosodást okozó, valamint a súlyos szemkárosodás vagy szemirritáció tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok (anyagok és keverékek) veszélyességi osztályba sorolására és címkézésére, az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet) ([1]) meghatározottak szerint.

2. A vegyi anyagok szemet érintő veszélyességi potenciáljának értékelése évek óta elsősorban egy nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálattal (az OECD 405. vizsgálati iránymutatásával egyenértékű B.5. vizsgálati módszerrel (8)) történik. Általánosan elfogadott, hogy az előre látható jövőben egyetlen alternatívaként használható *in vitro* vizsgálat sem tudja majd teljes körűen helyettesíteni a nyulakon végzett szemvizsgálatot a különböző kémiai osztályoknál felmerülő súlyos szemkárosodási/szemirritációs válaszreakciók teljes skálájának előrejelzésében. Előfordulhat azonban, hogy egy-egy (többszintű) vizsgálati stratégián belüli alternatív vizsgálati módszerek stratégiai kombinációja teljes körűen helyettesíteni tudja a nyulakon végzett szemvizsgálatot (2). A felülről építkező megközelítést olyan vegyi anyagok vizsgálatához dolgozták ki, amelyek a rendelkezésre álló információk alapján várhatóan rendkívül irritáló hatásúak lehetnek, vagy súlyos szemkárosodást idézhetnek elő. Ezzel szemben az alulról építkező megközelítés olyan vegyi anyagok vizsgálatához alkalmazandó, amelyek a meglévő információk alapján várhatóan nem okoznak a besorolás szükségességéhez elegendő szemirritációt. Bár a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer nem helyettesíti teljes körűen a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatot, többszintű vizsgálati stratégia – például felülről vagy alulról építkező megközelítés – részeként, szabályozói követelmények szerinti osztályozásra és címkézésre alkalmazva azonban használható arra, hogy további vizsgálatok szükségessége nélkül azonosítsa i. a súlyos szemkárosodást okozó (vagyis az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) vegyi anyagokat és ii. a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli” csoportjába tartozó) vegyi anyagokat (kivéve a rendkívül illékony anyagokat és a felületaktív anyagoktól eltérő szilárd vegyi anyagokat) (1) (2). Azok a vegyi anyagok azonban, amelyek a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer alapján előreláthatólag nem okoznak súlyos szemkárosodást (ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategória), vagy az ENSZ-GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli” csoportjába tartoznak (nem váltanak ki sem szemirritációt, sem súlyos szemkárosodást), a végleges osztályba sorolásukhoz további vizsgálatot tesznek szükségessé. Ezenfelül a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszernek az ENSZ-GHS/CLP-rendelettől eltérő osztályozási rendszeren belüli, alulról építkező megközelítés keretében történő alkalmazásáról egyeztetni kell a megfelelő szabályozó hatóságokkal. A legmegfelelőbb vizsgálati módszer kiválasztásához és e vizsgálati módszer alkalmazásához a súlyos szemkárosodási és bőrirritációs vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről szóló OECD-iránymutatás nyújt támpontokat (14).

3. E vizsgálati módszer ismerteti azokat az eljárásokat, amelyek felhasználhatók a vizsgálati vegyi anyagok szemet érintő veszélyességi potenciáljának értékelésére az alapján, hogy képesek-e a rövid expozíciós idejű vizsgálati rendszerben

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

▼M8

citotoxicitást kiváltani. A vegyi anyagoknak a szaruhártya felhámsejtjeire gyakorolt citotoxikus hatása fontos hatásmechanizmus, ami a szaruhártya felhámjának károsodásához és szemirritációhoz vezet. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerben a sejtek életképességét az alapján mérik, hogy az MTT (3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid), más néven tiazolil kék tetrazólium-bromid vitális festéket élő sejtek enzimatikus úton kék formazán kristállyá alakítják, amelynek mennyiségét a sejtekből történő kivonás után meghatározzák (3). Az ily módon megállapított sejtéletképességet összevetik az oldószeres kontrollnál mért életképességgel (ez a relatív életképesség), majd ennek alapján megbecsülik a vizsgálati vegyi anyag szemet érintő veszélyességi potenciálját. Egy adott vizsgálati vegyi anyagot akkor sorolnak az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába, ha 5 %-os és 0,05 %-os koncentrációja egyaránt 70 %-os vagy az alatti (≤ 70 %) sejtéletképességet idéz elő. Ezzel szemben akkor jelzik előre, hogy valamely vizsgálati vegyi anyag az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint „Kategória nélküli”, ha 5 %-os és 0,05 %-os koncentrációja egyaránt 70 %-ot meghaladó (> 70 %) sejtéletképességet eredményez.

4. E vizsgálati módszer esetében a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezés a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra vonatkozik, és nem a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer anyagok és/vagy keverékek vizsgálatára való alkalmazhatóságához kapcsolódik. A fogalmak meghatározása a függelékben található.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

5. Ez a vizsgálati módszer a Kao Corporation által kidolgozott protokollon alapul (4), amelyen két különböző validálási vizsgálatot végeztek el: az egyiket a japán állatkísérletek alternatív módszereivel foglalkozó társaság validálásért felelős bizottsága (JSAAE) (5), a másikat pedig a japán alternatív módszerek validálásával foglalkozó központ (JaCVAM) (6) hajtotta végre. A validálási tanulmány jelentései és vizsgálati módszer felülvizsgálatára vonatkozó háttérdokumentumok alapján a NICEATM/ICCVAM szakértői vizsgálatot végzett (7).

6. A súlyos szemkárosodást okozó (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) (1) vegyi anyagok (anyagok és keverékek) azonosítására történő alkalmazásakor a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer 125 (anyagokat és keverékeket is tartalmazó) vegyi anyag vizsgálata során nyert adatainak általános pontossága 83 % (104/125), álpozitív aránya 1 % (1/86), álnegatív aránya pedig 51 % (20/39) a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat adataival való összevetéskor (7). Az álnegatív eredmények aránya ebben az összefüggésben nem kritikus jelentőségű, mivel minden 5 %-os koncentrációban legfeljebb 70 %-os, és 0,05 %-os koncentrációban 70 %-nál nagyobb sejtéletképességet kiváltó vizsgálati vegyi anyag vizsgálatára sor kerülne más, megfelelően validált *in vitro* vizsgálati módszerekkel, vagy – a szabályozási követelményektől függően, és a jelenleg ajánlott lépcsőzetes vizsgálati stratégiával és bizonyítékok súlyozásán alapuló megközelítéssel összhangban (1) (8) – utolsó lehetőségként nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálattal. Elsősorban egy összetevőből álló anyagok vizsgálatára került sor, bár a keverékek vizsgálatára vonatkozóan is rendelkezésre áll korlátozott mennyiségű információ. A vizsgálati módszer mindazonáltal a több összetevőből álló anyagok és keverékek vizsgálatára technikailag alkalmazható. E vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt azonban meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer nem mutat egyéb hiányosságokat az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó vizsgálati vegyi anyagok azonosítására történő alkalmazásakor. A vizsgálók mérlegelhetik e vizsgálati módszer vizsgálati vegyi anyagon való alkalmazását, amely esetben az 5 %-os és 0,05 %-os koncentrációban egyaránt legfeljebb 70 %-os sejtéletképességet további vizsgálat nélkül az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába sorolandó súlyos szemkárosodást okozó reakcióra utaló jelként kell elfogadni.

▼**M8**

7. A szemirritáció és a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli” csoportjába tartozó) vegyi anyagok (anyagok és keverékek) azonosítására történő alkalmazásakor a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer 130 (anyagokat és keverékeket is tartalmazó) vegyi anyag vizsgálata során nyert adatainak általános pontossága 85 % (110/130), álnegatív aránya 12 % (9/73), álpozitív aránya pedig 19 % (11/57) a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat adataival való összevetéskor (7). Amikor a rendkívül illékony anyagok és a felületaktív anyagoktól eltérő szilárd vegyi anyagok nem szerepelnek az adatbázisban, a vizsgálati módszer általános pontossága 90 %-ra (92/102), álnegatív aránya 2 %-ra (1/54), álpozitív aránya pedig 19 %-ra (9/48) javul (7). Ebből következően a szemirritáció és a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli” csoportjába tartozó) vizsgálati vegyi anyagok azonosítására történő alkalmazásakor a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer potenciális hiányossága az álnegatív eredmények magas aránya i. a 6 kPa-t meghaladó gőznyomású rendkívül illékony anyagok, valamint ii. a felületaktív anyagoktól eltérő szilárd vegyi anyagok (anyagok és keverékek) és a kizárólag felületaktív anyagokból álló keverékek körében. Ezeket a vegyi anyagokat kizárják a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer alkalmazási köréből (7).

8. A 6. és a 7. pontban említett vegyi anyagokon túlmenően a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer adatbázisa magában foglalja 40 keverék belső vizsgálatokból származó adatait is, amelyek pontossága 88 % (35/40), álpozitív aránya 50 % (5/10), álnegatív aránya pedig 0 % (0/30) a Draize-féle *in vivo* szemvizsgálathoz képest, az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti osztályozási rendszerben besorolást nem igénylő keverékek előrejelzése terén (9). Ezért a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer alulról építkező megközelítés részeként alkalmazható az ENSZ-GHS/CLP-rendelet „Kategória nélküli” csoportjába tartozó keverékek azonosítására, kivételt képeznek ez alól – a szilárd anyagokra vonatkozó korlátozás kiterjesztésével – a csak felületaktív anyagokból álló keverékektől eltérő szilárd keverékek. Ezenfelül a 6 kPa-t meghaladó gőznyomású anyagokat tartalmazó keverékeket az esetleges alulkategorizálás elkerülése érdekében körültekintően kell értékelni, és előrejelzett besorolásukat eseti alapon kell megindokolni.

9. Az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó, de a 2., 2A. vagy 2B. kategóriába alulosztályozott vegyi anyagok, valamint az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti „Kategória nélküli” csoportba tartozó, de a 2., 2A. vagy 2B. kategóriába felülosztályozott vegyi anyagok jelentős száma miatt a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer nem alkalmazható a vizsgálati vegyi anyagok ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategóriába tartozóként, illetve ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2A. kategóriába (szemirritáló hatású) vagy 2B. kategóriába (enyhén szemirritáló hatású) tartozóként történő azonosítására (7). E célból egy másik megfelelő módszerrel végzett további vizsgálatra lehet szükség.

10. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer olyan vizsgálati vegyi anyagokhoz alkalmazható, amelyek oldhatók vagy legalább 5 perc alatt egyenletesen felszuszpendálhatók fiziológiás sóoldatban, 5 % dimetil-szulfoxidot (DMSO) tartalmazó sóoldatban vagy ásványolajban. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer nem alkalmazható olyan vizsgálati vegyi anyagokhoz, amelyek nem oldhatók vagy egyenletesen nem szuszpendálhatók legalább 5 perc alatt fiziológiás sóoldatban, 5 % DMSO-t tartalmazó sóoldatban vagy ásványolajban. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerben az ásványolaj használatát a rövid expozíciós idő teszi lehetővé. Ennek köszönhetően a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer alkalmas vízben oldhatatlan vizsgálati vegyi anyagok (pl. hosszú láncú zsíralkoholok vagy ketonok) szemet érintő veszélyességi potenciáljának előrejelzésére, amennyiben azok elegyednek legalább a három fent javasolt oldószer egyikében (4).

▼M8

11. E vizsgálati módszer esetében a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezés a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra vonatkozik ([1]) és nem a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer anyagok és/vagy keverékek vizsgálatára való alkalmazhatóságához kapcsolódik.

A VIZSGÁLAT ELVE

12. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer egy citotoxicitáson alapuló *in vitro* vizsgálat, amelyet 96 lyukú polikarbonát mikrolemezen tenyésztett, konfluens egyrétegű SIRC-sejteken (a Statens Serum Institut által előállított nyúl szaruhártya sejteken) hajtanak végre (4). A sejteket öt percen át kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal, majd MTT-vizsgálattal mennyiségileg meghatározzák a citotoxicitást, amit a SIRC-sejtek relatív életképességeként fejeznek ki (4). A sejtéletképesség csökkenése alapján jelzik előre a szemkárosodáshoz vezető potenciális káros hatásokat.

13. A vizsgálati jelentés szerint a nyúl szemébe csepegtetett oldatok 80 %-a három–négy percen belül kiürül a kötőhártyazsákon keresztül, míg az emberi szembe csepegtetett oldatok több mint 80 %-a egy–két percen belül kiürül (10). A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer igyekszik közelíteni egymáshoz ezeket az expozíciós időket, és a citotoxicitás mint végpont révén értékeli, hogy a vizsgálati vegyi anyaggal történő ötperces kezelésüket követően milyen mértékű károsodás keletkezett a SIRC-sejtekben.

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

14. A vizsgálati módszerben ismertetett rövid expozíciós idejű eljárás rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1. táblázatban ajánlott tizenegy anyag megfelelő besorolásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Ezeket az anyagokat úgy választották ki, hogy a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (405. vizsgálati iránymutatás) eredményei és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti osztályozási rendszer (1) alapján a súlyos szemkárosodási vagy szemirritációs válaszreakciók teljes tartománya szempontjából reprezentatívak legyenek. A kiválasztás másik kritériuma az volt, hogy az anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, azokra vonatkozóan magas minőségű *in vivo* referenciaadatok álljanak rendelkezésre, és a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerből származó, magas minőségű *in vitro* adatok álljanak rendelkezésre (3). Ha a jegyzékben szereplő valamely anyag nem áll rendelkezésre, illetve ha indokolható, megfelelő *in vivo* és *in vitro* referenciaadatokkal rendelkező más anyag is használható, amennyiben kiválasztása az itt ismertetett kritériumok szerint történik.

1. táblázat

A jártassági tesztanyagok jegyzéke

Anyag	CAS-szám	Kémiai osztály ([1])	Halmazállapot	*In vivo* ENSZ-GHS/CLP kat. ([2])	Rövid expozíciós idejű vizsgálat oldószere	Rövid expozíciós idejű vizsgálat ENSZ-GHS/CLP kat.
Benzalkónium-klorid (10 %, vizes oldat)	8001-54-5	Ónium-vegyület	Folyadék	1. kategória	Sóoldat	1. kategória
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Éter	Folyadék	1. kategória	Sóoldat	1. kategória

([1]) 2013 júniusában az OECD együttes ülése megállapodott abban, hogy ahol csak lehetséges, az új és átdolgozott vizsgálati módszerekben következetesebben alkalmazzák a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezést a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra.

▼**M8**

Anyag	CAS-szám	Kémiai osztály ([1])	Halmazállapot	*In vivo* ENSZ-GHS/ CLP kat. ([2])	Rövid expozíciós idejű vizsgálat oldószere	Rövid expozíciós idejű vizsgálat ENSZ-GHS/ CLP kat.
Acid Red 92	18472-87-2	Heterociklikus vegyület; Brómvegyület; Klórvegyület	Szilárd	1. kategória	Sóoldat	1. kategória
Nátrium-hidroxid	1310-73-2	Lúg; Szervetlen vegyi anyag	Szilárd	1. kategória ([3])	Sóoldat	1. kategória
Butirolakton	96-48-0	Lakton; Heterociklikus vegyület	Folyadék	2A. kategória (CLP szerinti 2. kategória)	Sóoldat	Előrejelzés nem végezhető
1-oktanol	111-87-5	Alkohol	Folyadék	2A./B. ([4]) kategória (CLP szerinti 2. kategória)	Ásványolaj	Előrejelzés nem végezhető
Ciklopentanol	96-41-3	Alkohol; Szénhidrogén, ciklikus	Folyadék	2A./B. ([5]) kategória (CLP szerinti 2. kategória)	Sóoldat	Előrejelzés nem végezhető
2-etoxietil-acetát	111-15-9	Alkohol; Éter	Folyadék	Kategória nélküli	Sóoldat	Kategória nélküli
Dodekán	112-40-3	Szénhidrogén, aciklikus	Folyadék	Kategória nélküli	Ásványolaj	Kategória nélküli
Metil-izobutil-keton	108-10-1	Keton	Folyadék	Kategória nélküli	Ásványolaj	Kategória nélküli

▼M8

Anyag	CAS-szám	Kémiai osztály ([1])	Halmazállapot	*In vivo* ENSZ-GHS/ CLP kat. ([2])	Rövid expozíciós idejű vizsgálat oldószere	Rövid expozíciós idejű vizsgálat ENSZ-GHS/ CLP kat.
1,1-Dimetil-guanidin-szulfát	598-65-2	Amidin; Kénvegyület	Szilárd	Kategória nélküli	Sóoldat	Kategória nélküli

([1]) A kémiai osztályba sorolásra a NICEATM korábbi publikációiban szereplő információk alapján került sor, illetve ilyen információk hiányában a Medicine's Medical Subject Headings (MeSH®) nemzeti könyvtárának adatai alapján (a ChemIDplus®-on [Nemzeti Orvostudományi Könyvtár] keresztül, elérhető a http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ címen), az anyagok szerkezete pedig a NICEATM alapján került meghatározásra.

([2]) A nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (az OECD 405. vizsgálati iránymutatása) eredményei alapján és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet (1) felhasználásával.

([3]) Az 1. kategóriába sorolásának alapja a 100 %-os nátrium-hidroxid bőrkorróziós hatása (bőrkorróziós hatású jártassági tesztanyagként szerepel az OECD 435. vizsgálati iránymutatásában) és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategória kritériumai (1).

([4]) A 2A. vagy 2B. kategóriába sorolás az ENSZ-GHS rendszerének a két kategória megkülönböztetésére szolgáló kritériuma értelmezésétől függ, azaz hat állatból kettőnél, illetve hat állatból négynél a hetedik napig fennmaradó hatások szükségesek a 2A. kategóriába soroláshoz. Az *in vivo* adatbázis 2 tanulmányon alapul, amelyek mindegyikét három állaton végezték el. Az egyik tanulmányban háromból két állaton a 7. napon is tapasztalhatók voltak a hatások, ami igazolta a 2A. kategóriába sorolást (11), míg a második tanulmányban mindhárom állatnál minden végpont teljesen meggyógyult (a hatást értékelő pontszám nulla volt), így az anyagot a 2B. kategóriába sorolták (12).

([5]) A 2A. vagy 2B. kategóriába sorolás az ENSZ-GHS rendszerének a két kategória megkülönböztetésére szolgáló kritériuma értelmezésétől függ, azaz három állatból egynél, illetve három állatból kettőnél a hetedik napig fennmaradó hatások szükségesek a 2A. kategóriába soroláshoz. Az *in vivo* vizsgálatot három állaton végezték. Az egy állaton megfigyelt szaruhártya-opálosodástól és kötőhártya-vörösségtől eltekintve minden végpont a 7. napra vagy már korábban teljesen begyógyult (a hatást értékelő pontszáma nulla volt). Annak az egy állatnak, amely nem gyógyult meg teljesen a hetedik napra, mind a szaruhártya opálosodását, mind a kötőhártya vörösségét értékelő pontszáma 1 volt (a 7. napon), majd a 14. napra teljesen meggyógyult (11).

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám.

ELJÁRÁS

Egyrétegű sejttenyészet elkészítése

15. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerhez nyúl szaruhártya eredetű sejtvonalat, SIRC-et kell használni. Ajánlatos a SIRC-sejteket egy megfelelő minősítéssel rendelkező sejtbankból, például az Amerikai Fajtakultúra Gyűjteményből (CCL60) beszerezni.

16. A SIRC-sejteket 10 % magzati borjú szérummal (FBS), 2 mM L-glutaminnal, 50–100 egység/ml penicillinnel és 50–100 µg/ml sztreptomicinnel kiegészített Eagle-féle minimum esszenciális tápfolyadékot (MEM) tartalmazó sejttenyésztő edényben, valamint 37 °C-os, 5 %-os CO_2-tartalmú és vízgőzzel telített környezetben kell tenyészteni. A sejttenyésztő edényben konfluenssé vált sejteket tripszin-etilén-diamin-tetraecetsavas oldattal fel kell szuszpendálni, sejtkaparó használatával vagy anélkül. A rutinszerű vizsgálat megkezdése előtt a sejteket (2–3 passzálással) felszaporítják a sejttenyésztő edényben, felolvasztás után azonban legfeljebb 25 passzálásig tartják fenn.

17. Ezt követően a rövid expozíciós idejű vizsgálatban való felhasználásra kész sejteket megfelelő sűrűségben előkészítik, majd kiszélesztik 96 lyukú lemezekbe. A sejtek ajánlott kiszélesztési sűrűsége lyukanként $6{,}0 \times 10^3$ sejt, ha a sejtek a kiszélesztést követő negyedik napon kerülnek felhasználásra, illetve lyukanként $3{,}0 \times 10^3$ sejt, ha a sejteket a kiszélesztést követő ötödik napon használják fel, a tenyésztéshez használt térfogat 200 µl. A rövid expozíciós idejű vizsgálathoz használt, megfelelő sűrűségben kiszélesztett sejtek a vizsgálat idejére, vagyis az átoltást követő negyedik vagy ötödik napra 80 %-ot meghaladó konfluenciával rendelkeznek majd.

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok alkalmazása

18. A vizsgálati vegyi anyagok feloldásához vagy szuszpendálásához alkalmazott oldószer tekintetében a fiziológiás sóoldat legyen az első választás. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag rosszul oldódik, vagy legalább öt percig nem

▼M8

lehet egyenletesen szuszpendálni a sóoldatban, akkor az 5 % DMSO-t (CAS-száma: 67-68-5) tartalmazó sóoldat legyen a második választás. Azon vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek sem sóoldatban, sem 5 % DMSO-t tartalmazó sóoldatban nem oldhatók vagy nem szuszpendálhatók egyenletesen legalább öt percig, az ásványolaj (CAS-száma: 8042-47-5) legyen a harmadik választás.

19. A vizsgálati vegyi anyagot 5 tömegszázalékos koncentrációban feloldják vagy egyenletesen szuszpendálják a választott oldószerben, majd tízszeres oldatsorozatot létrehozva további hígítással elkészítik 0,5 %-os és 0,05 %-os koncentrációját. Minden vizsgálati vegyi anyagot tesztelni kell 5 %-os és 0,05 %-os koncentrációban is. A 96 lyukú lemezen fenntartott sejtkultúrákat szobahőmérsékleten öt percen át kezelik a lyukanként 200 µl mennyiségű vizsgálati vegyi anyag 5 %-os vagy 0,05 %-os koncentrációjú oldatával (vagy szuszpenziójával). A vizsgálati vegyi anyagok (egy vagy több összetevőből álló anyagok, illetve keverékek) nagyjából tisztának tekintendők, ha a vizsgálati módszerben meghatározottak szerint hígítják vagy szuszpendálják őket, függetlenül a valós tisztaságuktól.

20. A 16. pontban ismertetett tápoldatot kell vivőanyagos kontrollként használni az összes ismétlés valamennyi lemezén. Emellett a sejteket az összes ismétlés minden lemezén vizsgálni kell oldószeres kontrollmintákban is. A 18. pontban felsorolt oldószerekről bizonyítást nyert, hogy nem befolyásolják károsan a SIRC-sejtek életképességét.

21. A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerben az összes ismétlés valamennyi lemezén 0,01 % nátrium-lauril-szulfátot (SLS) tartalmazó sóoldatot kell használni pozitív kontrollként. A pozitív kontroll sejtéletképességének meghatározása érdekében minden ismétlés összes lemezének tartalmaznia kell egy sóoldatos oldószeres kontrollt is.

22. Egy vakpróbára is szükség van az optikai sűrűség kompenzálásának meghatározásához, a vakpróbához használt lyukak csak foszfátpuffert tartalmazó sóoldatot tartalmaznak, nincs bennük se kalcium és magnézium (PBS-), se sejt.

23. Minden egyes mintát (az 5 %-os és 0,05 %-os koncentrációjú vizsgálati vegyi anyagot, a tápoldatos kontrollt, az oldószeres kontrollt és a pozitív kontrollt) minden ismétlés során triplikátumban kell vizsgálni úgy, hogy a sejteket szobahőmérsékleten öt percig kezelik a megfelelő vizsgálati vagy kontrollanyag 200 µl-ével.

24. A referenciaanyagok jól használhatók egy adott vegyianyag- vagy termékosztályba tartozó ismeretlen vegyi anyagok szemirritációs hatásának értékelésére vagy valamely szemirritációs anyag relatív irritatív hatásának az irritatív hatás egy adott tartományán belüli értékelésére.

A sejtek életképességének mérése

25. A kezelést követően a sejteket kétszer átmossák 200 µl foszfátpuffert tartalmazó sóoldattal, majd hozzáadnak 200 µl MTT-oldatot (0,5 mg MTT/ml tápoldat). Két óra inkubációt (37 °C, 5 % CO_2) követően az MTT-oldatot leszűrik, majd az MTT-formazán kivonásához 200 µl 0,04 N izopropanolos sósavval 60 percen át kezelik sötétben és szobahőmérsékleten, végül 570 nm-en mikrotiterlemez-olvasóval megmérik az MTT-formazán oldat abszorbanciáját. A vizsgálati vegyi anyagok csak abban az esetben befolyásolják az MTT-vizsgálat eredményét (színező vagy közvetlen MTT-redukáló hatásuk révén), ha a kezelést követő átmosás után jelentős mennyiségű vizsgálati vegyi anyag marad a vizsgálati rendszerben, ami előfordul a 3D-s rekonstruált emberi szaruhártya modell vagy a rekonstruált emberi felhám-modell szövetei esetén, azonban a rövid expozíciós idejű vizsgálati módszerben használt 2D-s sejtkultúrákra nem jellemző.

▼M8

Az eredmények értelmezése és az előrejelzési modell

26. Ezt követően az egyes vizsgálati vegyi anyagokra vonatkozó optikai sűrűség (OD) értéket kell felhasználni a 100 %-nak vett oldószeres kontrollhoz viszonyított sejtéletképesség kiszámításához. A százalékban kifejezett relatív sejtéletképességet úgy számolják ki, hogy a vizsgálati vegyi anyag OD-értékét elosztják az oldószeres kontroll OD-értékével, miután mindkét értékből kivonták a vakpróba OD-értékét.

$$Sejtéletképesség(\%) = \frac{(a\ vizsgálati\ vegyi\ anyag\ OD_{570}\ értéke) - (a\ vakpróba\ OD_{570}\ értéke)}{(az\ oldószeres\ kontroll\ OD_{570}\ értéke) - (a\ vakpróba\ OD_{570}\ értéke)} \times 100$$

Hasonlóképpen határozzák meg az egyes oldószeres kontrollok százalékban kifejezett relatív sejtéletképességét is: minden oldószeres kontroll OD-értékét elosztják a tápoldatos kontroll OD-értékével, miután mindkét értékből kivonták a vakpróba OD-értékét.

27. Három egymástól független ismétlést kell végezni, mindhármat triplikátum lyukkal (vagyis n=9). Az egyes független ismétléseken belül minden vizsgálati vegyi anyaghoz és oldószeres kontrollhoz tartozó három lyuk számtani átlaga alapján számítják ki a relatív sejtéletképesség számtani átlagát. A sejtéletképesség végső számtani átlagát a három független ismétlésből határozzák meg.

28. A vizsgálati vegyi anyagok súlyos szemkárosodást okozóként (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozóként), valamint a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint kategória nélküli) vegyi anyagokként történő meghatározására szolgáló sejtéletképességi határértékek az alábbiakban szerepelnek.

2. táblázat

A rövid expozíciós idejű vizsgálati módszer előrejelzési modellje

Sejtéletképesség		ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti besorolás	Alkalmazási kör
5 %-nál	0,05 %-nál		
> 70 %	> 70 %	Kategória nélküli	Anyagok és keverékek, kivéve: i. a 6 kPa-t meghaladó gőznyomású rendkívül illékony anyagok ([1]), és ii. a felületaktív anyagoktól eltérő szilárd vegyi anyagok (anyagok és keverékek) és a kizárólag felületaktív anyagokból álló keverékek.
≤ 70 %	> 70 %	Előrejelzés nem végezhető	Nem alkalmazandó
≤ 70 %	≤ 70 %	1. kategória	Anyagok és keverékek ([2])

([1]) A 6 kPa-t meghaladó gőznyomású anyagokat tartalmazó keverékeket az esetleges alulkategorizálás elkerülése érdekében körültekintően kell értékelni, és előrejelzett besorolásukat eseti alapon kell megindokolni.

([2]) Elsősorban egy összetevőből álló anyagok vizsgálatából nyert eredmények alapján, bár a keverékek vizsgálatára vonatkozóan is rendelkezésre állnak korlátozott mennyiségű adatok. A vizsgálati módszer mindazonáltal a több összetevőből álló anyagok és keverékek vizsgálatára technikailag alkalmazható. E vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

▼M8

Elfogadhatósági kritériumok

29. A vizsgálat eredményei akkor ítélhetők elfogadhatónak, amikor az alábbi kritériumok mindegyike teljesül:

a) A tápfolyadék (sejtekről leszívott tápoldat) kontroll optikai sűrűsége a vakpróba optikai sűrűségének kivonása után legalább 0,3.

b) Az oldószeres kontroll tápoldatos kontollhoz viszonyított életképessége legalább 80 %. Amennyiben az egyes ismétlésekben több oldószeres kontrollt végeznek, minden kontrollnak 80 %-ot meghaladó sejtéletképességet kell eredményeznie ahhoz, hogy minősíteni lehessen az adott oldószerrel tesztelt vizsgálati vegyi anyagokat.

c) A pozitív kontroll (0,01 % SLS) sejtéletképessége a dokumentált adatok átlaga körüli két szóráson belül van. A pozitív kontroll alsó és felső elfogadhatósági határértékét rendszeresen, vagyis háromhavonta, illetőleg a vizsgálatokat rendszertelenül, azaz havi egy alkalomnál ritkábban végző laboratóriumok esetében minden elfogadható vizsgálat után aktualizálni kell. Amennyiben valamely laboratórium nem végez elegendő számú kísérletet a pozitív kontrollok statisztikailag megbízható eloszlásának megállapítására, akkor elfogadható, hogy amíg az első rutinszerűen végzett belső vizsgálatok alapján meghatározzák az eloszlást, a módszer kidolgozói által megállapított alsó és felső elfogadhatósági határértékeket használják, amelyek laboratóriumuk dokumentált adatai szerint 21,1 % és 62,3 %.

d) A három független ismétlés alapján meghatározott végső sejtéletképesség szórása sem a vizsgálati vegyi anyag 5 %-os, sem a 0,05 %-os koncentrációjánál nem érheti el a 15 %-ot.

Ha e kritériumok közül egy vagy több nem teljesül, az eredményeket érvénytelennek kell nyilvánítani, és másik három független ismétlést kell végezni.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

30. Minden ismétlés tekintetében az egyes lyukakra vonatkozó adatokat (pl. a sejtéletképességi értékeket), az összesített átlagot, a szórást és a besorolást bele kell foglalni a vizsgálati jelentésbe.

Vizsgálati jelentés

31. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag és kontrollként szolgáló anyagok

— Egy összetevőből álló anyag: kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek: amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosságával (lásd fent), tisztaságával, mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival (lásd fent) jellemezve; amennyiben rendelkezésre állnak;

— fizikai megjelenés, illékonyság, pH-érték, LogP-érték, molekulatömeg, kémiai osztály, valamint a vizsgálat elvégzése szempontjából releváns további fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

▼**M8**

— tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak.

Vizsgálati módszer körülményei és eljárásai

— a megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe;

— az alkalmazott vizsgálati módszer leírása;

— az alkalmazott sejtvonal, annak eredete, valamint a vizsgálathoz használt sejtek passzálásainak száma és konfluenciájának mértéke;

— az alkalmazott vizsgálati eljárás részletei;

— az alkalmazott ismétlések és replikátumok száma;

— a vizsgálati vegyi anyag alkalmazott koncentrációi (ha eltér az ajánlottaktól);

— az oldószer kiválasztásának indoklása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében;

— a vizsgálati vegyi anyagnak való expozíció időtartama (ha eltér az ajánlottól);

— a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása;

— az alkalmazott értékelési és döntési kritériumok leírása;

— hivatkozás a pozitív történeti kontrollok átlagértékére és szórásaira;

— - a vizsgálati módszer végrehajtásában való laboratóriumi jártasság bizonyítása (például jártassági tesztanyagok vizsgálatával) vagy a vizsgálati módszer idővel reprodukálható végrehajtásának bizonyítása.

Eredmények

— A replikátum lyukankénti OD-értékek, az egyes független ismétlések OD-értékeinek számtani átlaga, az egyes független ismétlések sejtéletképességi aránya és a három ismétlés alapján meghatározott átlagos sejtéletképességi arány és szórás táblázatba foglalása az összes vizsgálati vegyi anyagra és kontrollanyagra, valamint minden vizsgált koncentrációra vonatkozólag;

— a tápoldatos, az oldószeres és a pozitív kontroll eredményei, amelyek igazolják a vizsgálat elfogadhatósági kritériumainak való megfelelést;

— a megfigyelt egyéb hatások leírása;

— az alkalmazott előrejelzési modellel/döntési kritériumokkal összhangban, az összesített eredmények alapján kialakított osztályozás.

▼**M8**

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) (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. Elérhető a következő címen:http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In vitro* 22, 760-770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In vitro* 25, 796-809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In vitro* 27, pp.1 855-1 869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Elérhető a következő címen:[http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) E melléklet B.5., Akut szemirritáció/szemkorrózió című fejezete.

(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.1 648-1 653.

(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). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

▼M8

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az egyezés megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (13).

Referencia-vegyianyag: a vizsgálati vegyi anyaggal való összevetéshez referenciaként használt anyag. A referencia-vegyianyagnak a következő tulajdonságokkal kell rendelkeznie: i. állandó és megbízható forrás(ok)ból kell származnia; ii. a vizsgálati vegyi anyagok osztályához hasonló szerkezettel és funkcionalitással kell rendelkeznie; iii. ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; iv. rendelkezésre kell állnia az ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és v.. a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

Alulról építkező megközelítés: a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében feltehetőleg besorolást nem igénylő vizsgálati vegyi anyag esetén alkalmazott lépcsőzetes megközelítés, amely a besorolást nem igénylő vegyi anyagok (negatív eredmény) más vegyi anyagokhoz (pozitív eredmény) viszonyított meghatározásával kezdődik.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Szemirritáció: a vizsgálati vegyi anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül teljes mértékben visszafordítható szemelváltozás. Megfelel a „reverzibilis szemkárosodás” fogalmának és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategóriának.

Álnegatív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen negatívnak minősített pozitív vegyi anyagok részaránya. A vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

Álpozitív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen pozitívnak minősített negatív vegyi anyagok részaránya. A vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

Tápoldatos kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó kezeletlen replikátum. Ezt a mintát a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt kell feldolgozni annak megállapításához, hogy az oldószer kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

MTT: 3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid; tiazolil kék tetrazólium-bromid.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

▼M8

OD: optikai sűrűség.

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (10).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik (13).

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (10).

Súlyos szemkárosodás: a vizsgálati vegyi anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a beadást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben. Megfelel az „irreverzibilis szemkárosodás” fogalmának és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriának.

Oldószeres/vivőanyagos kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét az oldószerrel vagy vivőanyaggal együtt tartalmazó nem kezelt minta, amelyet a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt kell feldolgozni az ugyanazon oldószerben feloldott vagy ugyanazon vivőanyaggal felvitt vizsgálati vegyi anyaggal kezelt minták kiindulási értékeinek megállapítása érdekében. Párhuzamos tápoldatos kontrollal elvégzett vizsgálata esetén ez a minta azt is bizonyítja, hogy az oldószer vagy vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Specificitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (13).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Felületaktív anyag: olyan vegyi anyag (például mosószer), amely csökkentheti a folyadékok felületi feszültségét, és így lehetővé teszi, hogy habozzanak vagy áthatoljanak szilárd anyagokon; nedvesítőszerként is ismert.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

▼M8

Többszintű vizsgálati stratégia: olyan lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amelynek keretében a vizsgálati vegyi anyagra vonatkozó valamennyi információt meghatározott sorrendben áttekintik, és az egyes szinteken az adatok bizonyító erejének elemzésével meghatározzák, hogy a következő szintre való továbblépés előtt a veszélyességi osztályozásra vonatkozó döntéshez elegendő információ áll-e rendelkezésre. Ha a vizsgálati vegyi anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján megállapítható, további vizsgálatra nincs szükség. Ha a vizsgálati vegyi anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján nem állapítható meg, több lépcsőben egymás után állatkísérleteket kell végezni mindaddig, amíg az egyértelmű besorolás meg nem állapítható.

Felülről építkező megközelítés: a feltehetőleg súlyos szemkárosodást okozó vizsgálati vegyi anyag esetén alkalmazott lépcsőzetes megközelítés, amely a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok (pozitív eredmény) más vegyi anyagokhoz (negatív eredmény) viszonyított meghatározásával kezdődik.

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategória: lásd: „Súlyos szemkárosodás”.

ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategória: lásd: „Szemirritáció”.

ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint kategória nélküli: az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. és 2. kategóriába (illetve az ENSZ-GHS 2A. vagy 2B. kategóriába) nem besorolt vegyi anyagok.

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, valamint komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

▼M8

B.69. **AZ EMBERI SZARUHÁRTYÁHOZ HASONLÓ REKONSTRUÁLT FELHÁMON (RhCE) ALAPULÓ VIZSGÁLATI MÓDSZER A SZEMIRRITÁCIÓ VAGY A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁS TEKINTETÉBEN BESOROLÁST NEM IGÉNYLŐ VEGYI ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA**

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 492. vizsgálati iránymutatásában (2017) leírt módszerrel. A *súlyos szemkárosodás* az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében (GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendeletében (CLP-rendelet) ([1]) meghatározottak szerint a vizsgálati vegyi anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a beadást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben. Szintén az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerint a *szemirritáció* a vizsgálati vegyi anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül teljes mértékben visszafordítható szemelváltozásokra utal. A súlyos szemkárosodást okozó vizsgálati vegyi anyagok az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába, míg a szemirritációt kiváltó vizsgálati vegyi anyagok az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerinti 2. kategóriába sorolandók. A szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében be nem sorolt vizsgálati vegyi anyagok olyan vegyi anyagok, amelyek nem tesznek eleget az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerinti 1. vagy 2. (2A. vagy 2B.) kategóriába való besorolás követelményeinek, vagyis azokra az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerint kategória nélküliként történik hivatkozás.

2. A súlyos szemkárosodás/szemirritáció vizsgálata jellemzően kísérleti állatokon történő vizsgálatot foglal magában (B.5. vizsgálati módszer (2)). A legmegfelelőbb vizsgálati módszer kiválasztásához és e vizsgálati módszer alkalmazásához a súlyos szemkárosodásra vonatkozó és bőrirritációs vizsgálatok és értékelések integrált megközelítéseiről szóló OECD-iránymutatás nyújt támpontokat (39).

3. Ez a vizsgálati módszer egy olyan *in vitro* eljárást ismertet, amely lehetővé teszi a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást és címkézést nem igénylő vegyi anyagok (anyagok és keverékek) ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti azonosítását. A módszerben az emberi szaruhártyahámhoz hasonló rekonstruált felhámot (RhCE) alkalmaznak, amely nagy hasonlósággal modellezi az emberi szaruhártya felhámjának szövettani, morfológiai, biokémiai és fiziológiai tulajdonságait. Négy másik *in vitro* vizsgálati módszert validáltak, nyilvánítottak tudományosan megalapozottnak és fogadtak el, a B.47. (3), B.48. (4), B.61. (5) és B.68. (6) vizsgálati módszert, amelyek mindegyike a súlyos szemkárosodással/szemirritációval mint az emberi egészség károsodásának egyik végpontjával foglalkozik.

4. E vizsgálati módszer két validált, kereskedelmi forgalomban kapható RhCE-modellt alkalmazó vizsgálatot foglal magában. Az EpiOcular™ szemirritációs vizsgálat (EIT) és a SkinEthic™ emberi szaruhártya felhám (HCE) használatán alapuló szemirritációs vizsgálat (EIT) alkalmazásával elvégezték a szemirritáció/súlyos szemkárosodás felmérésének validálási tanulmányait (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13). Mindkét vizsgálat kereskedelmi forgalomban beszerezhető RhCE-szövetkonstrukciót alkalmaz vizsgálati rendszerként, amelyre az alábbiakban validált referenciamódszerként – mint VRM1 és VRM2 – történik hivatkozás. E validálási

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról (HL L 353/1., 2008.12.31.).

▼M8

tanulmányok és független szakértői vizsgálatuk (9) (12) alapján megállapítást nyert, hogy az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT képes megfelelően azonosítani az ENSZ-GHS szerint szemirritáció vagy súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást és címkézést nem igénylő vegyi anyagokat (anyagokat és keverékeket egyaránt), és a vizsgálatok e célra történő alkalmazását tudományosan megalapozottnak tekintik és ajánlják (13).

5. Jelenleg általánosan elfogadott, hogy az előre látható jövőben egyetlen *in vitro* vizsgálati módszer sem tudja majd teljes körűen helyettesíteni a Draize-féle *in vivo* szemvizsgálatot (2) (14) a különböző kémiai osztályoknál felmerülő szemkárosodási/szemirritációs válaszreakciók teljes skálájának előrejelzésében. Előfordulhat azonban, hogy egy-egy (többszintű) vizsgálati stratégián, például az alulról/felülről építkező megközelítésen belüli több alternatív vizsgálati módszer stratégiai kombinációja teljes körűen helyettesíteni tudja a Draize-féle szemvizsgálatot (15). Az alulról építkező megközelítés (15) akkor alkalmazandó, amikor a meglévő információk alapján valamely vegyi anyag várhatóan nem okoz a besorolás szükségességéhez elegendő szemirritációt, míg a felülről építkező megközelítés (15) akkor alkalmazandó, amikor a meglévő információk alapján valamely vegyi anyag várhatóan súlyos szemkárosodást idéz elő. Az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT vizsgálat ajánlott az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (kategória nélküli) vegyi anyagok további vizsgálatot nem igénylő azonosítására, olyan vizsgálati stratégia keretében, mint a Scott és munkatársai által javasolt alulról/felülről építkező megközelítés, például az alulról építkező megközelítés első lépéseként, vagy a felülről építkező megközelítés egyik utolsó lépéseként (15). Az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT azonban nem alkalmas az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategória (súlyos szemkárosodás) és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategória (szemirritáció) megkülönböztetésére. Ezt a különbségtételt a vizsgálati stratégiai egy másik szintjén kell megvalósítani (15). Azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyeket az EpiOcular™ EIT vagy a SkinEthic™ HCE EIT vizsgálattal szemirritáció/súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást igénylőként azonosítottak, végleges kategorizálásuk (ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti nem besorolt, 2. kategória vagy 1. kategória) érdekében további (*in vitro* és/vagy *in vivo*) vizsgálatokat tesznek szükségessé, például a B.47., B.48., B.61. vagy B.68. vizsgálati módszer alkalmazásával.

6. E vizsgálati módszer ismerteti azt az eljárást, amely felhasználható a vizsgálati vegyi anyagok szemet érintő veszélyességi potenciáljának értékelésére az alapján, hogy az MTT-vizsgálat mérései szerint (16) képesek-e RhCE szövetkonstrukcióban citotoxicitást kiváltani (lásd a 21. pontot). A vizsgálati vegyi anyaggal való kezelését követően az RhCE szövet életképességét a negatív kontrollanyaggal kezelt szövetekkel való összevetésben határozzák meg (életképességi arány), amelyet azután felhasználnak a vizsgálati vegyi anyag szemet érintő veszélyességi potenciáljának előrejelzéséhez.

7. Az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT vizsgálathoz hasonló RhCE-alapú, új vagy módosított *in vitro* vizsgálatok validálásának megkönnyítéséhez rendelkezésre állnak az OECD 34. vizsgálati iránymutatásában (18) szereplő elvekkel összhangban kidolgozott teljesítményszabványok (17), amelyek lehetővé teszik az OECD 492. vizsgálati iránymutatásának időben történő módosítását az új vizsgálatok e vizsgálati iránymutatásba való beépítéséhez. Az adatok OECD-megállapodás szerinti kölcsönös elfogadása csak a teljesítményszabványoknak megfelelően validált vizsgálatok esetében lesz garantált, ha e vizsgálatokat az OECD felülvizsgálta és belefoglalta a megfelelő vizsgálati iránymutatásba.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

8. A fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

▼M8

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

9. Ez a vizsgálati módszer kereskedelmi forgalomban kapható, háromdimenziós RhCE-szövetkonstrukció használatán alapul, amelyet (az EpiOcular™ OCL-200 esetében) primér humán epidermális keratinocita sejtekből vagy (a SkinEthic™ HCE/S esetében) immortalizált humán szaruhártya felhámsejtekből állítottak elő. Az EpiOcular™ OCL-200 és a SkinEthic™ HCE/S RhCE szövetkonstrukciók hasonlatosak az *in vivo* szaruhártya felhám háromdimenziós felépítéséhez, és e szövetkonstrukciókat a vizsgált faj sejtjeiből állították elő (19) (20). Emellett a vizsgálatok közvetlenül mérik a citotoxicitást, a vegyi anyag szaruhártyán történő áthatolása és az általa előidézett sejt- és szövetkárosodás alapján; ez a citotoxicitási reakció határozza azután meg az *in vivo* súlyos szemkárosodási/szemirritációs vizsgálat összesített eredményét. A sejtkárosodás számos hatásmechanizmuson keresztül valósulhat meg (lásd a 20. pontot), de a citotoxicitás fontos, ha nem elsődleges szerepet játszik egy adott vegyi anyag által kiváltott általános súlyos szemkárosodási/szemirritációs reakció mechanisztikus meghatározásában, ami a szövetkárosodás hátterében álló fizikai-kémiai folyamatoktól függetlenül *in vivo* többnyire a szaruhártya opálosodásában, szivárványhártya-gyulladásban, a kötőhártya vörösségében és/vagy kötőhártya-vizenyőben nyilvánul meg.

10. A vizsgálati módszert alátámasztó validálási tanulmányban vegyi anyagok széles skáláját tesztelték, köztük számos, kémiai típus, kémiai osztály, molekulatömeg, LogP-érték, kémiai szerkezet stb. szempontjából eltérő anyagot. Az EpiOcular™ EIT validációs adatbázisa összesen 113 vegyi anyagot tartalmazott, amelyek – az OECD QSAR-eszköztár alapján végzett egyik elemzése szerint – 95 különböző szerves funkciós csoportba tartoznak (8). E vegyi anyagok többsége egykomponensű anyag, de a tanulmány kiterjedt néhány több összetevőből álló anyagra is (azon belül 3 homopolimerre, 5 kopolimerre és 10 kvázi polimerre). Halmazállapotuk és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti kategóriák tekintetében a 113 vizsgálati vegyi anyag a következőképpen oszlik meg: 131. kategóriába tartozó folyadék, 151. kategóriába tartozó szilárd anyag, 6 2A. kategóriába tartozó folyadék, 102A kategóriába tartozó szilárd anyag, 7 2B. kategóriába tartozó folyadék, 7 2B. kategóriába tartozó szilárd anyag, 27 kategória nélküli folyadék és 28 kategória nélküli szilárd anyag (8). A SkinEthic™ HCE EIT validációs adatbázisa összesen 200 vegyi anyagot tartalmazott, amelyek 165 különféle szerves funkciós csoportba tartoznak (8) (10) (11). E vegyi anyagok többsége egy összetevőből álló anyag, de a tanulmány kiterjedt néhány több összetevőből álló anyagra is (azon belül 10 polimerre). Halmazállapotuk és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti kategóriák tekintetében a 200 vizsgálati vegyi anyag a következőképpen oszlik meg: 271. kategóriába tartozó folyadék, 241. kategóriába tartozó szilárd anyag, 192A. kategóriába tartozó folyadék, 102A kategóriába tartozó szilárd anyag, 9 2B. kategóriába tartozó folyadék, 8 2B. kategóriába tartozó szilárd anyag, 50 kategória nélküli folyadék és 53 kategória nélküli szilárd anyag (10) (11).

11. A vizsgálati módszer alkalmazható anyagokra és keverékekre, valamint szilárd anyagokra, folyadékokra, félszilárd anyagokra és viaszos anyagokra. A folyadékok lehetnek vizesek vagy nem vizesek; a szilárd anyagok lehetnek vízben oldódóak vagy oldhatatlanok. Ahol megoldható, a szilárd anyagokat alkalmazásuk előtt finom porrá kell őrölni; a mintát előzetesen nem szükséges más módon kezelni. Gázokat és aeroszolokat validálási tanulmány keretében nem vizsgáltak. Bár elképzelhető, hogy ezek is vizsgálhatók az RhCE-technikával, a jelenlegi vizsgálati módszer nem engedi meg gázok és aeroszolok vizsgálatát.

12. Azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek (jellegükből fakadóan vagy a kezelés után) ugyanabban a tartományban nyelik el a fényt, mint az MTT-formazán, és azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek közvetlenül is képesek redukálni az MTT vitális festéket (MTT-formazánná), befolyásolhatják a szövet életképességének mérését, ennek korrigálása érdekében adaptált kontrollokra van szükség. Az esetlegesen szükséges adaptált kontrollok típusa függ a vizsgálati vegyi anyag által előidézett interferencia típusától és az MTT-formazán mennyiségének meghatározásához használt eljárástól (lásd a 36–42. pontot).

▼**M8**

13. Az elővalidálási (21) (22) és a teljes körű validálási (8) (10) (11) tanulmányok eredményei igazolták, hogy az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT egyaránt alkalmazható a vizsgálatok elvégzésében tapasztalattal nem rendelkező laboratóriumokban, továbbá a laboratóriumon belül és a laboratóriumok között is reprodukálható. E tanulmányok alapján az EpiOcular™ EIT vizsgálat 113 vegyi anyag adataira vonatkozó előrejelzéseinek egyezése alapján meghatározott várható reprodukálhatósági szintje a laboratóriumokon belül 95 %, a laboratóriumok között pedig 93 %. A SkinEthic™ HCE EIT vizsgálat 120 vegyi anyag adataira vonatkozó előrejelzéseinek egyezése alapján meghatározott várható reprodukálhatósági szintje a laboratóriumokon belül 92 %, a laboratóriumok között pedig 95 %.

14. Az EpiOcular™ EIT vizsgálat a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok ENSZ-GHS és CLP-rendelet osztályozási rendszere szerinti azonosítására alkalmazható. A validálási tanulmányban (8) gyűjtött adatok alapján az EpiOcular™ EIT általános pontossága 80 % (112 vegyi anyag alapján), érzékenysége 96 % (57 vegyi anyag alapján), álnegatív aránya 4 % (57 vegyi anyag alapján), specificitása 63 % (55 vegyi anyag alapján) és álpozitív aránya 37 % (55 vegyi anyag alapján) a referenciaként szolgáló nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatból (B.5. vizsgálati módszer) származó (2) (14), az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet osztályozási rendszere szerint azonosított adatokkal való összevetésben. Abban a tanulmányban, amelyben az EpiOcular™ EIT vizsgálattal 97 folyékony mezőgazdasági vegyszerkészítményt teszteltek, a vizsgálati módszer e keveréktípus tekintetében hasonló teljesítményt nyújtott, mint a validálási tanulmány során (23). A 97 készítmény eloszlása a következő: 211. kategóriájú, 192A. kategóriájú, 142B. kategóriájú és 43 kategória nélküli anyag, amelyek besorolása a referenciaként szolgáló nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatból (B.5. vizsgálati módszer) származó adatok alapján az ENSZ-GHS osztályozási rendszere szerint történt (2) (14). A besorolás általános pontossága 82 % (97 készítmény alapján), érzékenysége 91 % (54 készítmény alapján), álnegatív aránya 9 % (54 készítmény alapján), specificitása 72 % (43 készítmény alapján) és álpozitív aránya 28 % (43 készítmény alapján) volt (23).

15. A SkinEthic™ HCE EIT vizsgálat a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok ENSZ-GHS és CLP-rendelet osztályozási rendszere szerinti azonosítására alkalmazható. A validálási tanulmányban (10) (11) gyűjtött adatok alapján a SkinEthic™ HCE EIT általános pontossága 84 % (200 vegyi anyag alapján), érzékenysége 95 % (97 vegyi anyag alapján), álnegatív aránya 5 % (97 vegyi anyag alapján), specificitása 72 % (103 vegyi anyag alapján) és álpozitív aránya 28 % (103 vegyi anyag alapján) a referenciaként szolgáló nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatból (B.5. vizsgálati módszer) származó (2) (14), az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet osztályozási rendszere szerint azonosított adatokkal való összevetésben.

16. A két RhCE vizsgálat anyagoknál vagy keverékeknél elért álnegatív aránya belül marad azon a 12 %-os általános valószínűségi arányon, amellyel a vegyi anyagokat az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet szerinti 2. kategóriájába vagy az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet kategória nélküli csoportjába sorolják a Draize-féle *in vivo* szemvizsgálatban, ismételt vizsgálatok esetén; ez a módszerre jellemző vizsgálaton belüli variabilitásnak tudható be (24). A két RhCE vizsgálati módszer anyagoknál vagy keverékeknél mért álpozitív aránya e vizsgálati módszerben nem kritikus jelentőségű, mivel a (44. pontban szereplő) megállapított határértékkel megegyező vagy az alatti szövet-életképességet kiváltó vizsgálati vegyi anyagokon további vizsgálatokat kell végezni más *in vitro* vizsgálati módszerekkel, vagy utolsó lehetőségként – a szabályozási követelményektől függően, az adatok bizonyító erejének mérlegelésén alapuló megközelítés keretébe tartozó lépcsőzetes

▼M8

vizsgálati stratégia segítségével – nyulakon végzett vizsgálatokkal. Ezek a vizsgálati módszerek valamennyi típusú vegyi anyagra alkalmazhatók, az alkalmazásuk során kapott negatív eredményt a szemirritáció és a súlyos szemkárosodás tekintetében nem besorolandóként kell elfogadni (az ENSZ-GHS és a CLP-rendelet kategória nélküli csoportja). Az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EIT vizsgálat az ENSZ-GHS/CLP-rendelettől eltérő osztályozási rendszeren belüli alkalmazásáról egyeztetni kell a megfelelő szabályozó hatóságokkal.

17. E vizsgálati módszer korlátai közé tartozik, hogy nem teszi lehetővé a szemirritáció/reverzibilis szemkárosodás (2. kategória) és a súlyos szemkárosodás/irreverzibilis szemkárosodás (1. kategória) ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti megkülönböztetését, sem a szemirritáló hatás (opcionális 2A. kategória) és enyhén szemirritáló hatás (opcionális 2B. kategória) ENSZ-GHS szerinti megkülönböztetését (1). E célokból más *in vitro* vizsgálati módszerekkel végzett további vizsgálatra van szükség.

18. E vizsgálati módszer esetében a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezés a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra vonatkozik ([1]) és nem az RhCE vizsgálati módszer anyagok és/vagy keverékek vizsgálatára való alkalmazhatóságához kapcsolódik.

A VIZSGÁLAT ELVE

19. A vizsgálati vegyi anyagot legalább két háromdimenziós RhCE szövetkonstrukcióra viszik fel topikálisan, majd a kezelést és a kezelés utáni inkubációs időszakot követően meghatározzák a szövet-életképességet. Az RhCE szöveteket primér humán epidermális keratinocita sejtekből vagy immortalizált humán szaruhártya felhámsejtekből rekonstruálták, amelyeket több napon keresztül tenyésztettek, hogy egy olyan többrétegű, erősen differenciált laphámszövetet alkossanak, amely morfológiáját tekintve hasonló az emberi szaruhártya hámszövetéhez. Az EpiOcular™ RhCE szövetkonstrukció legalább 3 réteg élő sejtből és egy nem keratinizált felszínből tevődik össze, szaruhártyaszerű felépítése analóg az *in vivo* megtalálhatóval. A SkinEthic™ HCE RhCE szövetkonstrukció legalább 4 réteg élő sejtből áll, a normál emberi szaruhártya felhámhoz hasonlóan magában foglalva a bazális hengerhámsejteket, a közbenső szárnyas sejteket és a felszíni laphámsejteket (20) (26).

20. A vegyi anyagok által kiváltott súlyos szemkárosodás/szemirritáció – amely *in vivo* főként a szaruhártya opálosodásában, szivárványhártya-gyulladásban, a kötőhártya vörösségében és/vagy kötőhártya-vizenyőben nyilvánul meg – egy kaszkád jellegű folyamat eredménye, amelynek első lépéseként a vegyi anyag a szaruhártyán és/vagy a kötőhártyán áthatolva sejtkárosodást idéz elő. Sejtkárosodás bekövetkezhet számos hatásmechanizmuson, többek között a következőkön keresztül: sejtmembrán lízis (pl. felületaktív anyagok, szerves oldószerek váltják ki); makromolekulák (különösen fehérjék) koagulációja (pl. felületaktív anyagok, szerves oldószerek, lúgok és savak váltják ki); lipidek szappanosodása (pl. lúgok váltják ki); és alkilációk, illetve a makromolekulákkal kialakított egyéb kovalens kapcsolatok (pl. fehérítők, peroxidok és alkiláló szerek váltják ki) (15) (27) (28). Kimutatták azonban, hogy a citotoxicitás a szövetkárosodás hátterében álló fizikai-kémiai folyamatoktól függetlenül fontos, ha nem elsődleges szerepet tölt be egy adott vegyi anyag által kiváltott általános súlyos szemkárosodási/szemirritációs reakció mechanisztikus meghatározásában (29) (30). Ezenkívül a vegyi anyagok súlyos szemkárosodási/szemirritációs potenciálját elsősorban a kezdeti sérülés mértéke határozza meg (31), amely korrelációt mutat a sejtpusztulás mértékével

([1]) 2013 júniusában az OECD együttes ülése megállapodott abban, hogy ahol csak lehetséges, az OECD új és átdolgozott vizsgálati iránymutatásaiban következetesebben alkalmazzák a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezést a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra.

▼M8

(29), valamint a kiváltott reakciók és a végső következmények nagyságrendjével (32). Ennek megfelelően a nagyon enyhén irritáló anyagok általában csak a szaruhártya felhámjának felszínén fejtenek ki hatást, az enyhén és mérsékelten irritáló anyagok többnyire a felhámot és a kötőszövet felszínét károsítják, míg a súlyosan irritáló anyagok a felhámban, a kötőszövet belső rétegeiben és esetenként a szaruhártya belhámjában tesznek kárt (30) (33). A vizsgálati vegyi anyaggal történő topikális kezelését követően az RhCE szövetkonstrukció életképességének – a súlyos szemkárosodás/szemirritáció tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint nem besorolt) vegyi anyagok azonosítása céljából történő – mérése azon a feltevésen alapul, hogy a súlyos szemkárosodást vagy szemirritációt okozó összes vegyi anyag citotoxicitást idéz elő a szaruhártya felhámjában és/vagy a kötőhártyában.

21. Az RhCE szövet életképességét hagyományosan az alapján mérik, hogy az MTT [3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid; tiazolil kék tetrazólium-bromid; CAS-száma: 298-93-1)] vitális festéket a szövet élő sejtjei enzimatikus úton kék MTT-formazán kristállyá átalakítják, amelyet a szövetből történő kivonás után mennyiségileg meghatároznak (16). Azok a vegyi anyagok azonosíthatók az ENSZ-GHS/CLP-rendelet (nem besorolt) kategóriájának megfelelően besorolást és címkézést nem igénylő vegyi anyagokként, amelyek nem csökkentik a szövet-életképességet egy meghatározott határérték alá (vagyis az EpiOcular™ EIT és a SkinEthic™ HCE EITL ([1]) vizsgálatban 60 % alá, a SkinEthic™ HCE EITS ([2]) vizsgálatban pedig 50 % alá) (lásd a 44. pontot).

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

22. Az RhCE vizsgálatok szabályozási célú rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1. táblázatban felsorolt tizenöt jártassági tesztanyag besorolásának helyes előrejelzésével igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Ezeket a vegyi anyagokat a vizsgálati referenciamódszereken végzett validálási tanulmányokban használt vegyi anyagok közül választották ki (8) (10) (11). A lehetőségekhez mérten olyan vegyi anyagok kerülnek kiválasztásra, amelyek: i. különféle halmazállapotúak; ii. a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (B.5. vizsgálati módszer) (2) (14) magas minőségű eredményei, az ENSZ-GHS osztályozási rendszer (1., 2A., 2B. vagy nem besorolt kategória) (1) és a CLP-rendelet szerinti osztályozási rendszer (1., 2. vagy nem besorolt kategória) alapján lefedik a súlyos szemkárosodás/szemirritáció *in vivo* reakcióinak teljes tartományát; iii. lefedik az *in vivo* besorolást befolyásoló különböző hatásokat (24) (25); iv. a validálási tanulmányban használt kémiai osztályok tekintetében reprezentatívak (8) (10) (11); v. lefedik a megfelelő szerves funkcionális csoportok széles körét (8) (10) (11); vi. jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek (8) (10) (11); vii. színesek és/vagy közvetlen MTT-redukáló hatásúak; viii. megismételhető eredményeket hoztak az RhCE vizsgálati módszereken végzett validálási tanulmányok során; ix. besorolásukat helyesen jelezték előre az RhCE vizsgálati módszerek validálási tanulmánya során; x. az RhCE vizsgálati módszerekből származó kiváló minőségű adatok alapján lefedik az *in vitro* válaszreakciók teljes tartományát (0–100 %-os életképesség); xi. kereskedelmi forgalomban kaphatók; és xii. nem kapcsolódnak hozzájuk kiemelkedően magas beszerzési és/vagy ártalmatlanítási költségek. Amennyiben valamely felsorolt vegyi anyag nem áll rendelkezésre, illetve más megalapozott okból kifolyólag nem alkalmazható, akkor a fenti kritériumoknak megfelelő – például a vizsgálati referenciamódszer validálása során alkalmazott vegyi anyagok közül származó – vegyi anyag is használható. Az ilyen eltéréseket azonban meg kell indokolni.

([1]) EITL: a SkinEthic™ HCE folyadékokra alkalmazott szemirritációs vizsgálata.
([2]) EITS: a SkinEthic™ HCE szilárd anyagokra alkalmazott szemirritációs vizsgálata.

▼M8

1. táblázat

A jártassági tesztanyagok jegyzéke

Kémiai név	CAS-szám	Szerves funkciós csoport (1)	Halmazállapot	VRM1 életképessége (%) (2)	VRM2 életképessége (%) (3)	VRM szerinti előrejelzés	MTT-redukciós hatás	Színinterferencia
***In vivo* 1. kategória** (4)								
Metil-tioglikolát	2365-48-2	Karbonsavészter; Tioalkohol	F	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Előrejelzés nem végezhető	I (erősen)	N
Hidroxietil-akrilát	818-61-1	Akrilát; Alkohol	F	7,5 ± 4,7 (5)	1,6 ± 1,0	Előrejelzés nem végezhető	N	N
2,5-dimetil-2,5-hexándiol	110-03-2	Alkohol	Sz	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Előrejelzés nem végezhető	N	N
Nátrium-oxalát	62-76-0	Oxokarboxilsav	Sz	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Előrejelzés nem végezhető	N	N
***In vivo* 2A. kategória** (4)								
2,4,11,13-tetraaza-tetradekán-diimid-amid, N,N″-bisz(4-klórfenil)-3,12-diimino-, di-D-glükonát (20 %, vizes oldat) (6)	18472-51-0	Aromás szénhidrogén halogenid; Aril-halogenid; Dihidroxilcsoport; Guanidin	F	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Előrejelzés nem végezhető	N	I (enyhén)
Nátrium-benzoát	532-32-1	Aril; Karbonsav	Sz	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Előrejelzés nem végezhető	N	N
***In vivo* 2B. kategória** (4)								
Dietil-toluamid	134-62-3	Benzamid	F	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Előrejelzés nem végezhető	N	N
2,2-dimetil-3-metilén-biciklo [2.2.1] heptán	79-92-5	Alkán, tercier szenekhez sorolva; Alkén; Biciklohéptán; áthidalt gyűrűs karbociklusok; Cikloalkán	Sz	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Előrejelzés nem végezhető	N	N
***In vivo* nem besorolt** (4)								
1-etil-3-metilimidazolium-etil-szulfát	342573-75-5	Alkoxi; Ammóniumsó; Aril; Imidazol; Szulfát	F	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Kat. nélküli	N	N

▼M8

Kémiai név	CAS-szám	Szerves funkciós csoport ([1])	Halmazállapot	VRM1 életképessége (%) ([2])	VRM2 életképessége (%) ([3])	VRM szerinti előrejelzés	MTT-redukciós hatás	Színinterferencia
Dikaprilil-éter	629-82-3	Alkoxi; Éter	F	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Kat. nélküli	N	N
Piperonil-butoxid	51-03-6	Alkoxi; Benzodioxol; benzil; Éter	F	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Kat. nélküli	N	N
hidrogénezett ricinusolaj polietilénglikolja (PEG-40)	61788-85-0	Acilál; Alkohol; Allil; Éter	Viszkózus	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Kat. nélküli	N	N
1-(4-Klorofenil)-3-(3,4-diklorofenil)-karbamid	101-20-2	Aromás szénhidrogén halogenid; Aril-halogenid; Karbamidszármazékok	Sz	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Kat. nélküli	N	N
2,2′-metilén-bisz(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametil-butil)fenol)	103597-45-1	Alkán, kvaterner szenekhez sorolva; Fúziós aromás karbociklus; Fúziós telített heterociklusok; Kinoid vegyületek prekurzorai; Terc-butil	Sz	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Kat. nélküli	N	N
Kálium-tetrafluorborát	14075-53-7	Szervetlen só	Sz	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Kat. nélküli	N	N

Rövidítések:

CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám; ENSZ-GHS = a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (1); VRM1 = az EpiOcular™ EIT validált referenciamódszer; VRM2 = a SkinEthic™ HCE EIT validált referenciamódszer; Színinterferencia = az MTT-formazán hagyományos abszorbancia (optikai sűrűség, OD) mérését zavaró színinterferencia.

([1]) Az OECD eszköztár 3.1. beágyazott elemzése szerinti szerves funkció csoport (8).

([2]) Az EURL ECVAM/Cosmetics Europe szemirritációs validálási tanulmánya (EIVS) során végzett EpiOcular™ EIT vizsgálatban kapott eredmények alapján (8).

([3]) A validálási tanulmány során végzett SkinEthic™ HCE EIT vizsgálatban kapott eredmények alapján (10) (11).

([4]) A nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (B.5. vizsgálati módszer/az OECD 405. vizsgálati iránymutatása) (2) (14) eredményei alapján és az ENSZ-GHS felhasználásával.

([5]) A CEFIC konzorcium *in vitro* szemirritációs vizsgálati stratégiájához (CON4EI) végzett tanulmány eredményei alapján.

([6]) A 2A. vagy 2B. kategóriába sorolás az ENSZ-GHS rendszerének a két kategória megkülönböztetésére szolgáló kritériuma értelmezésétől függ, azaz három állatból egynél, illetve három állatból kettőnél a hetedik napig fennmaradó hatások szükségesek a 2A. kategóriába soroláshoz. Az *in vivo* vizsgálatot három állaton végezték. Az egy állaton megfigyelt szaruhártya-opálosodástól eltekintve minden végpont a 7. napra vagy már korábban teljesen begyógyult (a hatást értékelő pontszáma nulla volt). Annak az egy állatnak, amely nem gyógyult meg teljesen a hetedik napra, a szaruhártya opálosodását értékelő pontszáma 1 volt (a hetedik napon), majd a 9. napra teljesen meggyógyult.

23. A jártassági vizsgálat részeként ajánlott, hogy a felhasználók az RhCE szövetkonstrukció gyártója által meghatározottak szerint, átvétel után ellenőrizzék a szövetek barrierjellemzőit (lásd a 25., 27. és 30. pontot). Ez különösen fontos, ha a szöveteket nagy távolságra/hosszú ideig szállították. Ha egy vizsgálatot már sikeresen igazoltak, valamint jártasságot szereztek az alkalmazásában és bizonyították azt, ilyen jellegű ellenőrzéseket nem szükséges rutinszerűen végezni. Ha azonban egy vizsgálatot rutinszerűen alkalmaznak, a barrierjellemzőket javasolt továbbra is rendszeres időközönként ellenőrizni.

▼M8

ELJÁRÁS

24. E vizsgálati módszerhez jelenleg a tudományosan megalapozottnak nyilvánított EpiOcular™ EIT és SkinEthic™ HCE EIT vizsgálat tartozik (9) (12) (13), amelyekre a szöveg validált referenciamódszerként is hivatkozik (az előbbi sorrend szerint VRM1 és VRM2). Az RhCE vizsgálati módszerekhez rendelkezésre állnak szabványműveleti eljárások, amelyeket alkalmazni kell e vizsgálati módszerek laboratóriumi végrehajtása és igénybevétele során (34) (35). A következő pontok és a 2. függelék ismertetik az RhCE vizsgálatok főbb összetevőit és eljárásait.

AZ RHCE VIZSGÁLATI MÓDSZER ÖSSZETEVŐI

Általános feltételek

25. A megfelelő emberi eredetű sejtekből rekonstruált szaruhártyaszerű háromdimenziós felhámszövetet fokozatosan rétegzett, de nem elszarusodott sejtekből kell előállítani. Az RhCE szövetkonstrukciót úgy készítik, hogy porózus szintetikus membránt inzertálnak, amelyen keresztül a tápanyagok eljutnak a sejtekhez. A rekonstruált szaruhártyaszerű felhámban élő, nem keratinizált epitélsejtek több rétegének kell jelen lennie. Az RhCE szövetkonstrukció felhámjának felszíne közvetlenül érintkezzen a levegővel, hogy a szaruhártya felhámjának *in vivo* kezeléséhez hasonló módon közvetlenül kezelni lehessen topikálisan a vizsgálati vegyi anyaggal. Az RhCE szövetkonstrukciónak megfelelő ellenálló képességgel rendelkező funkcionális barriert kell képeznie a citotoxikus referencia-vegyianyagok, pl. a Triton X-100 vagy a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) gyors áthatolása ellen. A barrierfunkciót bizonyítani kell, ennek értékeléséhez meghatározható az az expozíciós idő, amely alatt egy adott, állandó koncentrációjú referencia-vegyianyag (pl. 100 µl mennyiségű 0,3 térfogatszázalékos Triton X-100) hatására a szövetek életképessége 50 %-kal csökken (ET_{50}), vagy az a referencia-vegyianyag koncentráció, amely meghatározott idejű expozíciót (pl. 30 perces kezelés 50 µl SDS-sel) követően 50 %-kal csökkenti a szövetek életképességét (IC_{50}) (lásd a 30. pontot). Az RhCE szövetkonstrukció folyadékzáró tulajdonságainak meg kell akadályozniuk, hogy a vizsgálati vegyi anyag passzáljon az élő szövet szélei körül, amely a szaruhártya expozíciójának rossz modellezését eredményezné. Az RhCE szövetkonstrukció előállításához használt emberi eredetű sejteknek baktérium-, vírus-, mikoplazma- és gombafertőzéstől mentesnek kell lenniük. A forgalmazónak ellenőriznie kell, hogy a szövetkonstrukció steril, gomba- és baktériumfertőzéstől mentes.

Funkcionális feltételek

Életképesség

26. A szövetek életképességének számszerű mérése MTT-vizsgálattal történik (16). Az RhCE szövetkonstrukció élő sejtjei az MTT vitális festéket kék MTT-formazán kicsapódássá redukálják, amelyet azután izopropanol (vagy hasonló oldószer) használatával kivonnak a szövetből. A kivont MTT-formazán mennyisége meghatározható hagyományos abszorbancia (optikai sűrűség, OD) méréssel vagy HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással (36). Az extraháló oldószer optikai sűrűségének (OD) eléggé alacsonynak, azaz 0,1 alattinak kell lennie. Az RhCE szövetkonstrukció felhasználóinak biztosítaniuk kell, hogy az alkalmazott RhCE szövetkonstrukció minden egyes tétele megfeleljen a negatív kontrollra vonatkozóan meghatározott kritériumoknak. A vizsgálati referenciamódszerek negatív kontrolljaira vonatkozó OD-értékek elfogadhatósági tartományát a 2. táblázat ismerteti. A HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás alkalmazása esetén a negatív kontroll elfogadhatósági feltételeként a 2. táblázatban szereplő negatív kontrollra vonatkozó OD-tartományok szolgálnak. A vizsgálati jelentésben dokumentálni kell, hogy a negatív kontrollanyaggal kezelt szövetek stabilak a tenyészetben (hasonló szövet-életképességi értékeket adnak) a vizsgálat során alkalmazott expozíciós időszak alatt. A szövet gyártójának a szövet készítés során hasonló eljárást kell lefolytatnia a szövettételek jóváhagyása előtti minőség-ellenőrzéskor, erre az esetre azonban a 2. táblázatban

▼M8

szereplőktől eltérő elfogadhatósági kritériumok alkalmazhatók. Az RhCE szövetkonstrukció előállítójának/forgalmazójának meg kell határoznia a negatív kontroll során nyert OD-értékek (a vizsgálati módszer minőség-ellenőrzési körülményei mellett érvényes) elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékeket).

2. táblázat

A negatív kontroll OD-értékének elfogadhatósági tartománya (a vizsgálat felhasználói számára)

Vizsgálat	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (mind a folyadékok, mind a szilárd anyagok protokolljánál)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (mind a folyadékok, mind a szilárd anyagok protokolljánál)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Ez az elfogadhatósági határérték figyelembe veszi az esetlegesen hosszabbra nyúló (pl. 4 napot meghaladó) szállítási/tárolási időt, amelyről kimutatták, hogy nem befolyásolja a vizsgálati módszer teljesítményét (37).

Barrierfunkció

27. Az RhCE szövetkonstrukciónak megfelelő vastagsággal és ellenálló képességgel kell rendelkeznie ahhoz, hogy például az ET_{50} alapján végzett becslések szerint (Triton X-100 esetében) vagy az IC_{50} alapján végzett becslések szerint (SDS esetén) (3. táblázat) meg tudja akadályozni a citotoxikus referencia-vegyianyagok gyors áthatolását. Az RhCE szövetkonstrukció előállítójának/forgalmazójának, a szövetek végfelhasználóhoz történő kiszállításakor bizonyítania kell az alkalmazott RhCE szövetkonstrukció minden egyes tételének barrierfunkcióját (lásd a 30. pontot).

Morfológia

28. Az RhCE szövetkonstrukció szövettani vizsgálatának igazolnia kell az emberi szaruhártyáéhoz hasonló felhámfelépítést (legalább 3 élő epitélsejtekből álló réteg és egy nem keratinizált felszín). A validált referenciamódszerek tekintetében az előállítónak/forgalmazónak gondoskodnia kell a szövetkonstrukció megfelelő morfológiájáról, ezért ezt a vizsgálati módszer felhasználójának az egyes alkalmazott szövettételeknél nem szükséges ismételten igazolnia.

Reprodukálhatóság

29. A vizsgálati módszer alkalmazása során végzett pozitív és negatív kontrollok eredményeinek igazolniuk kell a módszer időbeni megismételhetőségét.

Minőség-ellenőrzés

30. Az RhCE szövetkonstrukció csak abban az esetben használható, ha előállítója/forgalmazója igazolja, hogy az alkalmazott RhCE szövetkonstrukció minden egyes tétele megfelel a gyártás utáni jóváhagyásra vonatkozóan meghatározott feltételeknek, amelyek közül az életképességre (26. pont) és a barrierfunkcióra (27. pont) vonatkozó kritériumok a leglényegesebbek. Az ET_{50} vagy IC_{50} érték által mért (lásd a 25. és a 26. pontot) barrierfunkció elfogadhatósági tartományát (alsó és felső határértékét) az RhCE szövetkonstrukció előállítójának/forgalmazójának kell meghatároznia. A 3. táblázat ismerteti az ET_{50} és az IC_{50} érték azon elfogadhatósági tartományát, amelyet (a validált referenciamódszerekben) az RhCE szövetkonstrukciók előállítója/forgalmazója a tételjóváhagyás előtti minőség-ellenőrzés során alkalmaz. A gyártás utáni jóváhagyásra vonatkozóan meghatározott feltételeknek való megfelelést igazoló adatokat az RhCE szövetkonstrukció előállítójának/forgalmazójának a vizsgálati módszer felhasználóinak rendelkezésére kell bocsátania, hogy ezeket az információkat fel tudják tüntetni a vizsgálati jelentésben. Kizárólag a gyártás utáni felszabadításra vonatkozóan meghatározott összes feltételnek megfelelő szövetekkel elért eredmények fogadhatók el a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást és címkézést nem igénylő vegyi anyagok ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti besorolásának megbízható előrejelzéseként.

▼M8

3. táblázat

Tételjóváhagyás előtti minőség-ellenőrzés kritériumai

Vizsgálat	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3 térfogatszázalékos Triton X-100)	ET_{50} = 12,2 perc	ET_{50} = 37,5 perc
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30 perces kezelés 50 µl SDS-sel)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

A vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok alkalmazása

31. Minden vizsgálatmenetben valamennyi vizsgálati vegyi anyaghoz és kontrollanyaghoz legalább két szövetreplikátumot kell használni. Két különböző kezelési protokoll alkalmazható, az egyik folyékony, a másik szilárd vizsgálati vegyi anyagokhoz (34) (35). Mindkét módszer és protokoll esetében a vizsgálati vegyi anyaggal történő kezelés előtt a szövetkonstrukció felületét be kell nedvesíteni kalcium- és magnéziummentes Dulbecco-féle foszfátpuffert tartalmazó sóoldattal (Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS), megteremtve ezzel az emberi szemre jellemző nedves feltételeket. A szövetek kezelése a vizsgálati vegyi anyag(ok)nak és a kontrollanyagoknak való expozícióval veszi kezdetét. Mindkét validált referenciamódszer mindkét kezelési protokolljában a vizsgálati vegyi anyagot és a kontrollanyagot megfelelő mennyiségben kell alkalmazni ahhoz, hogy az egyenletesen fedje a felhám felszínét, ugyanakkor el kell kerülni a végtelen dózis alkalmazását (lásd a 32. és 33. pontot) (2. függelék).

32. A validált referenciamódszerekben a 37 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten (szükség esetén finnpipettával) pipettázható vizsgálati vegyi anyagokat folyadékként kell kezelni, ellenkező esetben szilárd anyagokként kezelendők (lásd a 33. pontot). A validált referenciamódszerekben a folyékony vizsgálati vegyi anyagokat egyenletesen kell eloszlatni a szövet felszínén (ehhez legalább 60 µl/cm^2 mennyiség szükséges) (lásd a 2. függeléket (33) (34)). A szövet megfelelő dózissal történő kezelése érdekében a lehetőségekhez mérten kerülni kell, hogy az inzertre (a szövet felszínére) felvitt vizsgálati vegyi anyag kis térfogata miatt kapilláris hatás (hajszálcsövesség) alakuljon ki. A folyékony vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szöveteket a szokásos tenyésztési körülmények mellett (37 ±2 °C, 5 ±1 %-os CO_2, legalább 95 %-os relatív páratartalom) 30 percig inkubálni kell. Az inkubációs idő lejártával a folyékony vizsgálati vegyi anyagot és a kontrollanyagokat óvatosan el kell távolítani a szövet felszínéről, ehhez szobahőmérsékleten Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS-sel alaposan át kell mosni a szövetet. Az átmosást követően a szövetet az alkalmazott validált referenciamódszertől függően változó, előre meghatározott időtartamig frissen készített, szobahőmérsékletű tápoldatba kell meríteni (ezáltal eltávolíthatók a szövetbe abszorbeált vizsgálati vegyi anyagok). Kizárólag a VMR1 esetén az MTT-vizsgálat végrehajtása előtt a szövetet frissen készített tápoldatban, szokásos tenyésztési körülmények között expozíció utáni inkubációnak kell alávetni (lásd a 2. függeléket (34) (35)).

33. A validált referenciamódszerekben a 37 °C-os hőmérsékletig nem pipettázható vizsgálati vegyi anyagokat szilárd anyagokként kell kezelni. A vizsgálati vegyi anyagokat olyan mennyiségben kell alkalmazni, amely képes befedni a szövet teljes felületét, ehhez legalább 60 mg/cm^2 mennyiségre van szükség (lásd a 2. függeléket). A szilárd anyagokat, amikor csak lehetséges finom por alakban kell vizsgálni. A szilárd vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szöveteket egy előre meghatározott (az alkalmazott validált referenciamódszertől függő) időszakon keresztül a szokásos tenyésztési körülmények közepette inkubálják (lásd a 2. függeléket (34) (35)). Az expozíciós idő lejártával a szilárd vizsgálati vegyi anyagot és a kontrollanyagokat óvatosan el kell távolítani a szövet felszínéről, ehhez szobahőmérsékleten Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS-sel alaposan át kell mosni a szövetet. Az átmosást követően kerül sor az expozíció utáni merítésre,

▼M8

amikor a szövetet az alkalmazott validált referenciamódszertől függően változó, előre meghatározott időtartamig frissen készített, szobahőmérsékletű tápoldatba merítik (ezáltal eltávolíthatók a szövetbe abszorbeált vizsgálati vegyi anyagok), majd az MTT-vizsgálatot megelőzően frissen készített tápoldatban, szokásos tenyésztési körülmények között expozíció utáni inkubálásra kerül sor (lásd a 2. függeléket (34) (35)).

34. Minden vizsgálatmenetben párhuzamos negatív és pozitív kontrollokkal bizonyítani kell, hogy a szövetek (negatív kontroll alapján meghatározott) életképessége és (pozitív kontroll alapján meghatározott) érzékenysége a dokumentált adatok alapján meghatározott elfogadhatósági tartományba esik. A párhuzamos negatív kontroll szolgáltatja emellett az alapvonalat (a 100 %-os szövet-életképességet) a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szövetek relatív életképességi arányának ((életképesség$_{vizsgált}$ aránya) kiszámításához. A validált referenciamódszerekhez ajánlott pozitív kontrollanyag a tiszta metil-acetát (CAS-száma: 79-20-9, forgalmazza például a Sigma-Aldrich, katalógusszáma: 45997; folyadék). A VRM1, illetve a VRM2 vizsgálathoz alkalmazandó ajánlott negatív kontrollanyag az ultra nagytisztaságú víz, illetve a Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS. Ezeket a kontrollanyagokat használták a validált referenciamódszereken végzett validálási tanulmányokban, és ezekhez áll rendelkezésre a legtöbb ismert adat. A megfelelő alternatív pozitív vagy negatív kontrollanyagok alkalmazását tudományosan és kellő mértékben alá kell támasztani. A negatív és pozitív kontrollanyagokat ugyanazon protokoll(ok) alapján kell tesztelni, mint a vizsgálatmenetben részt vevő vizsgálati vegyi anyagokat (vagyis a folyadékokhoz és/vagy a szilárd anyagokhoz készült protokollal). A folyékony vizsgálati vegyi anyagok tesztelésével párhuzamosan végzett kontrollok (lásd a 32. pontot) vagy a szilárd vizsgálati vegyi anyagok tesztelésével párhuzamosan végzett kontrollok (lásd a 33. pontot) leírása szerint a kijuttatást követően és még az MTT-vizsgálatot megelőzően sor kerül az expozícióra, az átmosásra, az expozíciót követő merítésre és adott esetben az expozíciót követő inkubálásra (lásd a 35. pontot) (34) (35). Az azonos vizsgálatmenetben tesztelt azonos halmazállapotú (folyékony vagy szilárd) vizsgálati vegyi anyagok esetében elegendő egyetlen negatív és pozitív kontrollt vizsgálni.

A szövetek életképességének mérése

35. Az MTT-vizsgálat egy szabványosított kvantitatív eljárás (16), amelyet e vizsgálati módszer során a szövetek életképességének méréséhez kell alkalmazni. A vizsgálat kompatibilis a háromdimenziós szövetkonstrukcióban történő használattal. Az MTT-vizsgálatot közvetlenül az expozíció utáni inkubációs időszakot követően hajtják végre. A validált referenciamódszerekben az RhCE szövetkonstrukciót a szokásos tenyésztési körülmények mellett 180 percre (±15 perc) 0,3 ml mennyiségű, 1 mg/ml koncentrációjú MTT-oldatba helyezik. Az MTT vitális festéket az RhCE szövetkonstrukció élő sejtjei kék MTT-formazán kicsapódássá redukálják. Ezt követően a kicsapódott kék MTT-formazán terméket megfelelő mennyiségű izopropanol (vagy hasonló oldószer) használatával kivonják a szövetből (34) (35). A folyékony vizsgálati vegyi anyaggal tesztelt szövetek esetében a szövetek tetejéről és aljáról is ki kell vonni az MTT-t, míg a szilárd vizsgálati vegyi anyagokkal és színes folyadékokkal tesztelt szöveteknél csak a szövet aljáról kell kivonni az MTT-t (ezáltal minimalizálni lehet az izopropanol extraháló oldat esetleges átszennyezését a szöveten maradt vizsgálati vegyi anyaggal). A nehezen lemosható folyékony vizsgálati vegyi anyaggal tesztelt szöveteknél szintén megengedhető, hogy a terméket csak a szövet aljáról vonják ki. A párhuzamosan vizsgált negatív és pozitív kontrollanyagokat a vizsgálati vegyi anyaggal azonos módon kell kezelni. A kivont MTT-formazán mennyisége meghatározható hagyományos abszorbancia (OD) méréssel egy sávszűrő alkalmazásával 570 nm hullámhosszon (maximum ±30 nm-es eltérés megengedett), vagy egy HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján (lásd a 42. pontot) (11) (36).

▼M8

36. A vizsgálati vegyi anyag optikai tulajdonságai vagy az MTT-re gyakorolt kémiai hatása folytán befolyásolhatja az MTT-formazán mérését, ami a szövet-életképesség helytelen megbecsüléséhez vezet. A vizsgálati vegyi anyagok befolyásolhatják az MTT-formazán mérését azáltal, hogy közvetlenül kék MTT-formazánná redukálják az MTT-t és/vagy azáltal, hogy színinterferenciát okoznak, ha a vizsgálati vegyi anyag jellegénél fogva vagy a kezelési eljárás következtében az MTT-formazánnal azonos OD-tartományban (vagyis kb. 570 nm-en) nyeli el a fényt. A vizsgálat előtt előzetes méréseket kell végezni, amelyek lehetővé teszik a potenciálisan közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező és/vagy színinterferenciát okozó vegyi anyagok azonosítását, és további kontrollokat kell alkalmazni e vizsgálati vegyi anyagok potenciális zavaró hatásának észleléséhez és korrekciójához (lásd a 37–41. pontot). Ez különösen fontos abban az esetben, amikor egy adott vizsgálati vegyi anyagot nem távolítottak el teljesen az RhCE szövetkonstrukcióból a mosás során, vagy amikor az anyag áthatol a szaruhártyaszerű felhámon, és így az MTT-vizsgálat elvégzése során jelen van az RhCE szövetkonstrukcióban. Azon vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek (jellegüknél fogva vagy a kezelés következtében) az MTT-formazánnal azonos tartományban nyelik el a fényt, és amelyek túlságosan zavaró hatásúak, vagyis erőteljes adszorpciót mutatnak 570 ±30 nm-en, ezért az MTT-formazán hagyományos abszorbancia (OD) mérésével nem vizsgálhatók, az MTT-formazán HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárással történő meghatározását lehet alkalmazni (lásd a 41. és 42. pontot) (11) (36). A validált referenciamódszerek szabványműveleti eljárásai részletes leírással szolgálnak arról, hogyan lehet észlelni és korrigálni a közvetlen MTT-redukáló hatást és a színezőanyagok okozta zavaró hatást (34) (35). A VRM1, illetve a VRM2 vizsgálathoz rendelkezésre álló, a III., illetve IV. függelékben közzétett szemléltető folyamatábrák iránymutatást nyújtanak ahhoz, hogyan lehet azonosítani és kezelni a közvetlen MTT-redukáló és/vagy színinterferenciát okozó vegyi anyagokat.

37. Annak érdekében, hogy azonosítani lehessen azon vizsgálati vegyi anyagok potenciális zavaró hatását, amelyek (jellegüknél fogva vagy a kezelés következtében) az MTT-formazánnal azonos tartományban nyelik el a fényt, és dönteni lehessen a további kontrollok szükségességéről, a vizsgálati vegyi anyagot vízbe és/vagy izopropanolba helyezik, és megfelelő ideig szobahőmérsékleten inkubálják (lásd a 2. függeléket (34) (35)). Ha a VRM1 vizsgálatban (lásd a 3. függeléket) a vízbe és/vagy izopropanolba helyezett vizsgálati vegyi anyag 570 ± 20 nm-es tartományban kellő mennyiségű fényt nyeli el, vagy ha a VRM2 vizsgálatban (lásd a 4. függeléket) a vizsgálati vegyi anyag vízzel történő elegyítése során színes oldat keletkezik, a vizsgálati vegyi anyag feltehetően befolyásolja az MTT-formazán hagyományos abszorbancia (OD) mérését és további színezőanyag-kontrollokra van szükség, illetve alternatív megoldásként HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárást lehet végezni, amelynek alkalmazásakor ezek a kontrollok nem szükségesek (lásd a 41. és 42. pontot, valamint a III. és IV. függeléket) (34) (35). Hagyományos abszorbancia (OD) mérés esetén az egyes zavaró hatású vizsgálati vegyi anyagokkal legalább két élő szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot, de az MTT inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat, hogy létrehozzanak egy élő szöveteken végzett nem specifikus elszíneződés ($NSC_{élő}$) kontrollt (34) (35). Az élő szövetekre jellemző biológiai változékonyságból kifolyólag az $NSC_{élő}$ kontrollt a színes vizsgálati vegyi anyag vizsgálatával párhuzamosan kell elvégezni, több vizsgálat esetén pedig (minden egyes vizsgálatmenetnél) minden vizsgálattal egyidejűleg független $NSC_{élő}$ kontrollt kell végezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT-oldatban inkubált élő szövetek életképességi arányából ($Életképesség_{vizsgált}$ arány) levonják a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyagnak kitett és MTT-mentes közegben inkubált élő szövetek nem specifikus elszíneződésének arányát, amelyet a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan vizsgáltak ($NSC_{élő}$ arány), tehát a szövetek valódi életképessége = [$Életképesség_{vizsgált}$ arány] - [$NSC_{élő}$ arány].

38. A közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező anyagok azonosítása érdekében minden vizsgálati vegyi anyagot friss MTT-oldatba kell helyezni. Az MTT-oldathoz megfelelő mennyiségű vizsgálati vegyi anyagot adagolnak,

▼M8

majd a keveréket mintegy 3 órán keresztül a szokásos tenyésztési körülmények közepette inkubálják (lásd a III. és a IV. függeléket) (34) (35). Amennyiben a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó MTT-keverék (illetve oldhatatlan vizsgálati vegyi anyag esetén szuszpenzió) színe kékre/lilára változik, a vizsgálati vegyi anyag feltételezhetően közvetlenül redukálja az MTT-t, ezért kiegészítő funkcionális ellenőrzést kell végezni elhalt RhCE szövetkonstrukciókon, független vizsgálat keretében, hagyományos abszorbancia (OD) mérés, illetve HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján. E kiegészítő funkcionális ellenőrzés során elhalt szöveteket használnak, amelyek reziduális metabolikus aktivitással rendelkeznek csupán, ugyanakkor az élő szövetekhez hasonló módon abszorbeálják és magukban tartják a vizsgálati vegyi anyagot. A VRM1 elhalt szöveteit úgy állítják elő, hogy a szöveteket alacsony hőmérsékletnek teszik ki („fagyasztással elölt szövet"). A VRM2 elhalt szöveteit pedig úgy állítják elő, hogy a szöveteket hosszabb ideig (legalább 24 ±1 órán keresztül) vízben inkubálják, majd alacsony hőmérsékleten tárolják („vízben elölt" szövet). Az egyes MTT-redukáló hatású vizsgálati vegyi anyagokkal legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot azzal a céllal, hogy egy nem specifikus MTT-redukciós (NSMTT) kontrollt hozzanak létre (34) (35). A független vizsgálatok/vizsgálatmenetek számától függetlenül vizsgálati vegyi anyagonként elegendő egyetlen NSMTT-kontrollt végezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez az MTT-redukáló anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból (Életképesség$_{vizsgált}$ arány) levonják az ugyanazon MTT-redukáló anyaggal kezelt elhalt szövetekkel kapott nem specifikus MTT-redukció arányát, amelyet a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan végzett negatív kontrollhoz viszonyítva számítanak ki (NSMTT-arány), tehát a szövetek valódi életképessége = [Életképesség$_{vizsgált}$ arány] - [NSMTT-arány].

39. Azon hagyományos abszorbancia (OD) méréssel értékelt vizsgálati vegyi anyagok esetében, amelyek egyaránt okoznak színinterferenciát (lásd a 37. pontot) és közvetlen MTT-redukciót (lásd a 38. pontot), az előző pontokban ismertetett NSMTT és NSC$_{élő}$ kontrollok mellett szükség van egy harmadik fajta kontrollra is. Általában ez a helyzet áll elő a fényt 570 ±30 nm-en elnyelő, sötét színű (pl. kék, lila, fekete) vizsgálati vegyi anyagoknál, mivel saját színük akadályozza, hogy a 38. pontban leírtak szerint értékelni lehessen közvetlen MTT-redukáló hatásukat. Ilyen esetben alapértelmezetten el kell végezni mind az NSMTT, mind az NSC$_{élő}$ kontrollt. Előfordulhat, hogy azokat a vizsgálati vegyi anyagokat, amelyeken NSMTT és NSC$_{élő}$ kontrollt is végeztek, mind az élő, mind az elhalt szövetek abszorbeálják és magukban tartják. Ilyenkor az NSMTT kontroll nem csupán a vizsgálati vegyi anyag által előidézett közvetlen MTT-redukáló hatást korrigálja, hanem esetleg az anyag elhalt szövetek általi abszorpciójából és benntartásából eredő színinterferenciát is. Ez viszont a színinterferencia kétszeri korrekciójához vezethet, mivel az NSC$_{élő}$ kontroll már korrigálja a vizsgálati vegyi anyag élő szövetek általi abszorpciójából és benntartásából fakadó színinterferenciát. A színinterferencia esetleges kétszeri korrekciójának kiküszöbölése érdekében szükség van egy harmadik kontrollra, amely az elhalt szövetek esetében méri a nem specifikus elszíneződést (NSC$_{elhalt}$) (lásd a III. és IV. függeléket) (34) (35). E kiegészítő kontroll során a vizsgálati vegyi anyaggal legalább két elhalt szövetreplikátumot kezelnek, amelyeken elvégzik a teljes vizsgálatot, de az MTT inkubációs fázis során MTT-mentes oldatba helyezik azokat. A független vizsgálatok/vizsgálatmenetek számától függetlenül vizsgálati vegyi anyagonként elegendő egyetlen NSC$_{elhalt}$ kontroll, azt azonban az NSMTT kontrollal egyidejűleg és ugyanazon szövettételen kell elvégezni. Ezután meghatározzák a szövetek valódi életképességét, ehhez a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott életképességi arányból (Életképesség$_{vizsgált}$ arány) levonják az NSMTT-arányt és levonják az NSC$_{élő}$ arányt, majd hozzáadják a zavaró hatású vizsgálati vegyi anyaggal kezelt és MTT-mentes közegben inkubált elhalt szövetekkel kapott nem specifikus elszíneződési arányt, amelyet a korrigálandó vizsgálattal párhuzamosan végzett negatív kontrollhoz viszonyítva számítanak ki (NSC$_{elhalt}$ arány), tehát a szövetek valódi életképessége = [Életképesség$_{vizsgált}$ arány] - [NSMTT-arány] - [NSC$_{élő}$ arány] + [NSC$_{elhalt}$ arány].

▼M8

40. Lényeges megjegyezni, hogy (hagyományos abszorbancia mérés esetén) a nem specifikus MTT-redukció és a nem specifikus színinterferencia a spektrofotométer linearitási tartománya fölé növelheti a szövetkivonat OD-értéket, és (HPLC/UPLC spektrofotometriás mérés esetén) a nem specifikus MTT-redukció a spektrofotométer linearitási tartománya fölé növelheti a szövetkivonat MTT-formazán csúcsterületét is. Ebből kifolyólag fontos, hogy minden laboratórium például MTT-formazán (CAS-száma: 57360-69-7, forgalmazza például a Sigma-Aldrich vállalat, Cat# M2003) segítségével az OD-értékre/csúcsterületre vonatkozólag meghatározza spektrofotométerének linearitási tartományát, mielőtt megkezdené a vizsgálati vegyi anyagok szabályozási célú vizsgálatát.

41. A spektrofotométert használó hagyományos abszorbancia (OD) mérés akkor alkalmazható a közvetlen MTT-redukáló hatással bíró és színinterferenciát okozó vizsgálati vegyi anyagok értékelésére, amikor az MTT-formazán mérésekor tapasztalt zavaró hatás nem túl erőteljes (vagyis a szövetkivonatok vizsgálati vegyi anyaggal kapott, közvetlen MTT-redukció és/vagy színinterferencia tekintetében nem korrigált OD-értékei a spektrofotométer linearitási tartományán belül vannak). Mindazonáltal a negatív kontroll 60 %-ával (a VRM1, valamint a VRM2 folyadékokra vonatkozó protokollja esetén) vagy 50 %-ával (a VRM2 szilárd anyagokra vonatkozó protokollja esetén) egyező vagy annál nagyobb NSMTT-arányt és/vagy $NSC_{élő}$ arányt előidéző vizsgálati vegyi anyagok eredményei óvatosan értelmezendők, mivel ezeket a határértékeket használják a validált referenciamódszerekben a kategorizált és a nem kategorizált vegyi anyagok megkülönböztetésére (lásd a 44. pontot). Ha viszont a vizsgálati vegyi anyag túl erőteljesen zavarja az MTT-formazán mérését (vagyis a vizsgált szövetkivonatok nem korrigált OD-értékei kívül esnek a spektrofotométer linearitási tartományán), a standard abszorbancia (OD) nem mérhető. Az MTT-formazán hagyományos abszorbancia (OD) mérését túlzott mértékben befolyásoló színes vizsgálati vegyi anyagok, illetve vízzel vagy izopropanollal való érintkezés következtében elszíneződött vizsgálati vegyi anyagok mérése elvégezhető HPLC/UPLC spektrofotometriás eljárás útján (lásd a III. és IV. függeléket). A HPLC/UPLC rendszer ugyanis lehetővé teszi, hogy az MTT-formazánt mennyiségi meghatározása előtt elkülönítsék a vegyi anyagtól (36). Ezért HPLC/UPLC spektrofotometriás módszer használata esetén a vizsgálati vegyi anyagtól függetlenül soha nincs szükség $NSC_{élő}$ és NSC_{elhalt} kontrollra. Az NSMTT-kontroll ugyanakkor alkalmazandó (a 38. pontban ismertetett módon), ha a vizsgálati vegyi anyag gyaníthatóan közvetlenül redukálja az MTT-t. Az NSMTT-kontroll akkor is alkalmazandó, ha a vizsgálati vegyi anyag (saját vagy vízzel való érintkezés következtében kialakult) színe miatt közvetlen MTT-redukáló hatását nem lehet a 38. pontban ismertetett módon felmérni. Amennyiben HPLC/UPLC spektrofotometriásan mérik az MTT-formazánt, a szövetek életképességi aránya a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt élő szövetekkel kapott MTT-formazán csúcsterület és a párhuzamos negatív kontrollal kapott MTT-formazán csúcsterület aránya lesz. A közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező vizsgálati vegyi anyagok esetében a szövetek valódi életképességét a 38. pont utolsó mondatában leírt módon számítják ki: [$Életképesség_{vizsgált}$ arány] mínusz [NSMTT-arány]. Végül megjegyzendő, hogy azok a közvetlen MTT-redukáló hatású, vagy színinterferenciát is okozó közvetlen MTT-redukáló vegyi anyagok, amelyek a kezelést követően visszamaradnak a szövetben és olyan erős MTT-redukáló hatással bírnak, hogy a vizsgált szövetkivonatok OD-értéke (hagyományos OD mérés esetén), illetve csúcsterülete (HPLC/UPLC spektrofotometriás mérés esetén) kívül esik a spektrofotométer linearitási tartományán, az RhCE vizsgálati módszerekkel nem értékelhetők, bár ilyen csak igen ritka esetben fordul elő.

42. A HPLC/UPLC spektrofotometria bármely típusú vizsgálati vegyi anyagnál (színes, nem színes, MTT-redukáló vagy nem MTT redukáló hatású) alkalmazható az MTT-formazán mérésére (11) (36). A HPLC/UPLC spektrofotometriás

▼M8

rendszerek sokfélesége miatt a felhasználók nem tudnak azonos rendszerkörülményeket teremteni. Ezért a szövetkivonatok MTT-formazán-tartalmának meghatározása előtt igazolni kell a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítését azzal, hogy eleget tesznek az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelete (FDA) által az iparág számára kiadott, bioanalitikus módszerek validálására vonatkozó iránymutatásban (36) (38) szereplő standard minősítési paramétereken alapuló elfogadhatósági kritériumoknak. E kulcsfontosságú paraméterekről és elfogadhatósági kritériumokról a 5. függelék nyújt tájékoztatást. Amint eleget tettek a 5. függelékben meghatározott elfogadhatósági kritériumoknak, a HPLC/UPLC spektrofotometriás rendszer minősítettnek tekintendő, és alkalmas arra, hogy az itt leírt vizsgálati módszerben bemutatott kísérleti feltételek mellett elvégezze az MTT-formazán mérését.

Elfogadhatósági kritériumok

43. Minden olyan vizsgálatmenet esetében, amelynek során a minőség-ellenőrzési kritériumoknak megfelelő RhCE szövettételeket alkalmaznak (lásd a 30. pontot), a negatív kontrollanyaggal kezelt szöveteknek olyan OD-értéket kell mutatniuk, amely tükrözi a szöveteknek a szállítási és az átvételi lépéseket, valamint az összes protokollfolyamatot követő minőségét, és nem léphetik túl a dokumentált adatok alapján meghatározott, 2. táblázatban szereplő határértékeket (lásd a 26. pontot). Hasonlóképpen a pozitív kontrollanyaggal, vagyis a metil-acetáttal kezelt szövetek negatív kontrollhoz viszonyított átlagos életképességének 50 % alatt kell maradnia a VRM1 folyadékokra és szilárd anyagokra vonatkozó protokolljában, míg a VRM2 protokoll esetén legfeljebb 30 % (folyadékokra vonatkozó protokoll) vagy 20 % (szilárd anyagokra vonatkozó protokoll) lehet, mert ez igazolja, hogy a vizsgálati módszer feltételei mellett a szövetek képesek reagálni egy irritáló vizsgálati vegyi anyagra (34) (35). A vizsgálati vegyi anyagokkal és kontrollanyagokkal kezelt szövetreplikátumok variabilitásának az elfogadott határértékeken belül kell maradnia (vagyis két szövetreplikátum variabilitása közötti különbség nem haladhatja meg a 20 %-ot, illetve három szövetreplikátum közötti standard deviáció (SD) nem haladhatja meg a 18 %-ot). Amennyiben egy adott vizsgálatmenet negatív vagy pozitív kontrollja kívül esik az elfogadott tartományon, a vizsgálatmenetet érvénytelennek kell nyilvánítani, és meg kell ismételni. Amennyiben egy adott vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szövetreplikátumok közötti variabilitás kívül esik az elfogadott tartományon, a vizsgálatot érvénytelennek kell nyilvánítani, és a vizsgálati vegyi anyagot újbóli vizsgálatnak kell alávetni.

Az eredmények értelmezése és az előrejelzési modell

44. Az egyes vizsgálati vegyi anyagokkal kezelt szövetkivonat-replikátumokra vonatkozóan kapott OD-értékek/csúcsterületek alapján kell meghatározni a (100 %-nak vett) negatív kontrollra normalizált átlagos szövet-életképesség százalékos arányát (a szövetreplikátumok átlagát). A 4. táblázat ismerteti a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti kategória nélküli) vizsgálati vegyi anyagok azonosítására használt százalékos szövet-életképességi határértékeket. Az eredmények tehát az alábbiak szerint értelmezendők:

— A vizsgálati vegyi anyagot nem szükséges az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint osztályozni és címkézni (vagyis az anyag kategória nélküli), ha a szövet kezelést és expozíció utáni inkubációt követően megállapított átlagos életképességi aránya meghaladja (>) a szövet-életképesség meghatározott százalékos határértékét (lásd a 4. táblázatot). Ebben az esetben más vizsgálati módszerekkel végzett további vizsgálatra nincs szükség.

▼M8

— Amennyiben a szövet kezelést és expozíció utáni inkubációt követően megállapított átlagos életképességi aránya megegyezik a szövet-életképesség meghatározott százalékos határértékével vagy annál kisebb (≤) (lásd a 4. táblázatot), besorolása nem előrejelezhető. Ebben az esetben más vizsgálati módszerekkel végzett további vizsgálatra van szükség, mert az RhCE vizsgálati módszerek álpozitív eredményhez vezethetnek (lásd a 14. és 15. pontot), továbbá nem tudnak különbséget tenni az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. és 2. kategória között (lásd a 17. pontot).

4. táblázat

Az ENSZ-GHS/CLP-rendelet osztályozási rendszere szerinti előrejelzési modellek

VRM szerinti	Kategória nélküli	Előrejelzés nem végezhető
VRM 1 – EpiOcular™ EIT (mindkét protokoll)	Átlagos szövet-életképesség > 60 %	Átlagos szövet-életképesség ≤ 60 %
VRM 2 – SkinEthic™ HCE EIT (folyadékokra vonatkozó protokoll)	Átlagos szövet-életképesség > 60 %	Átlagos szövet-életképesség ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™ HCE EIT (szilárd anyagokra vonatkozó protokoll)	Átlagos szövet-életképesség > 50 %	Átlagos szövet-életképesség ≤ 50 %

45. Egyértelmű eredmény esetén legalább két szövetreplikátum vizsgálatából álló egyszeri vizsgálatnak elegendőnek kell lennie az adott vizsgálati vegyi anyag esetében. Határértéken lévő eredmények esetében azonban, ha például az egyes szövetreplikátumok eredményei nem egyeznek és/vagy a szövetek átlagos életképességi aránya 60 ± 5 % (VRM1, valamint a VRM2 folyadékokra vonatkozó protokollja esetén) vagy 50 ± 5 % (a VRM2 szilárd anyagokra vonatkozó protokollja esetén), megfontolandó egy második vizsgálat lefolytatása, és ha az első és a második vizsgálat eredményei különbözőek, egy harmadiké is.

46. A keverékek bizonyos típusainál, ahol megfelelő és indokolt, mérlegelni lehet más százalékos szövet-életképességi határértékek alkalmazását a besorolt és a nem besorolt vizsgálati vegyi anyagok közötti különbségtételhez, hogy az adott keveréktípusok tekintetében javítani lehessen a vizsgálati módszer általános teljesítményét (lásd a 14. pontot). A referencia-vegyianyagok hasznosnak bizonyulhatnak ismeretlen vizsgálati vegyi anyagok vagy termékosztályok súlyos szemkárosodási/szemirritációs potenciáljának értékelésére vagy valamely besorolt vegyi anyag szemre kifejtett relatív toxicitási hatásának a pozitív válaszreakciók egy adott tartományán belüli értékelésére.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

47. Mindegyik vizsgálati vegyi anyagra vonatkozóan táblázatos jelentést kell készíteni a vizsgálatmenetben tesztelt egyes szövetreplikátumok adatairól (például OD-értékek/MTT-formazán csúcsterületek, a vizsgálati vegyi anyagra és a kontrollanyagokra vonatkozólag meghatározott százalékos szövet-életképességi adatok és az RhCE vizsgálati módszer végső előrejelzése), amelyben szerepelnie kell a megismételt kísérletek adatainak is, ha voltak ilyenek. Emellett minden vizsgálati vegyi anyagra és kontrollanyagra vonatkozólag fel kell tüntetni a jelentésben az átlagos szövet-életképességi arányt és a két szövetreplikátum életképessége közötti különbséget (ha n=2 szövetreplikátum) vagy a standard deviációt (ha n≥ 3 szövetreplikátum). Ezenfelül bele kell foglalni a jelentésbe azt is, ha valamely vizsgálati vegyi anyagról megfigyelték, hogy közvetlen MTT-redukáló hatása és/vagy színinterferencia miatt befolyást gyakorol az MTT-formazán mérésére.

Vizsgálati jelentés

48. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

▼**M8**

Vizsgálati vegyi anyag

Egy összetevőből álló anyag

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— fizikai megjelenés, illékonyság, pH-érték, LogP-érték, molekulatömeg, kémiai osztály, valamint a vizsgálat elvégzése szempontjából releváns további fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak.

Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), tisztaságával, mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival (lásd fent) jellemezve; amennyiben rendelkezésre állnak;

— fizikai megjelenés és a vizsgálat elvégzése szempontjából releváns további fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak.

Pozitív és negatív kontrollanyagok

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— fizikai megjelenés, illékonyság, molekulatömeg, kémiai osztály, valamint a vizsgálat elvégzése szempontjából releváns további fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— tisztaság, adott és a gyakorlatban megvalósítható esetben a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— adott esetben az ultra nagytisztaságú víztől, illetve a Ca2+/Mg2+-mentes DPBS-től eltérő negatív kontrollanyag használatának indokolása;

— adott esetben a tiszta metil-acetáttól eltérő pozitív kontrollanyag használatának indokolása;

— a pozitív és negatív kontrollanyagok a vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumainak való megfelelőségét bizonyító korábbi eredményei.

A megbízó és a vizsgálatot végző laboratórium adatai

— A megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe.

— *Az alkalmazott RhCE szövetkonstrukció és protokoll (valamint használatuk indokolása, amennyiben szükséges)*

▼**M8**

A vizsgálati módszer körülményei

— az alkalmazott RhCE szövetkonstrukció és gyártási szám;

— az MTT-formazán mennyiségi meghatározására használt hullámhossz és (adott esetben) a sávszélesség, valamint a mérőeszköz (pl. spektrofotométer) linearitási tartománya;

— az MTT-formazán számszerű mérésére alkalmazott módszer leírása;

— az alkalmazott HPLC/UPLC-spektrofotometriás rendszer leírása, ha releváns;

— az alkalmazott specifikus RhCE szövetkonstrukcióra vonatkozó teljes körű alátámasztó adatok, köztük a modell teljesítménye. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia:

  i) a minőség-ellenőrzés során mért életképesség (forgalmazó által szolgáltatott adat);

  ii) a vizsgálati módszer feltételei mellett mért életképesség (felhasználó által szolgáltatott adat);

  iii) barrierfunkció minőség-ellenőrzése;

  iv) morfológia, ha rendelkezésre áll;

  v) reprodukálhatóság és előrejelző képesség;

  vi) az RhCE szövetkonstrukció egyéb minőség-ellenőrzési paraméterei, ha vannak;

— hivatkozás az RhCE szövetkonstrukcióval kapott korábbi adatokra. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia: a minőség-ellenőrzési adatok elfogadhatósága tekintettel a korábbi tételadatokra;

— nyilatkozat arról, hogy a vizsgálatot végző intézmény a jártassági tesztanyagok vizsgálata révén bizonyította a vizsgálati módszer végrehajtásában való jártasságát annak rutinszerű használata előtt.

A vizsgálatmenet és a vizsgálat elfogadásának kritériumai

— a pozitív és negatív kontrollok átlaga és elfogadhatósági tartománya a korábbi adatokon alapul;

— a pozitív és negatív kontrollokban használt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás;

— a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt szövetreplikátumok közötti elfogadható mértékű variabilitás.

Vizsgálati eljárás

— az alkalmazott vizsgálati eljárás részletei;

— a vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok alkalmazott dózisa;

— az expozíció, az expozíció utáni merítés és az expozíció utáni inkubáció időtartama és az alkalmazott hőmérséklet (adott esetben);

— a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása;

▼M8

— a közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező és/vagy színváltozást okozó vizsgálati vegyi anyagokhoz alkalmazott kontrollok feltüntetése, amennyiben releváns;

— vizsgálati vegyi anyagonként és kontrollonként (pozitív kontroll, negatív kontroll, NSMTT, $NSC_{élő}$ és NSC_{elhalt}, ha releváns) használt szövetreplikátumok száma.

Eredmények

— az egyes vizsgálati vegyi anyagokra és kontrollanyagokra, minden vizsgálatmenetre (ideértve az esetlegesen elvégzett megismételt kísérleteket is) és replikátummérésre vonatkozó adatok, többek között az OD-érték vagy az MTT-formazán csúcsterület, a szövetek életképességi aránya, a szövetek átlagos életképességi aránya, a szövetreplikátumok közötti eltérések vagy standard deviáció és a végső előrejelzés táblázatba foglalása;

— amennyiben alkalmazandó, a közvetlen MTT-redukáló hatású és/vagy színes vizsgálati vegyi anyagokhoz használt kontrollok eredményei, ideértve az OD-értéket vagy az MTT-formazán csúcsterületet, az NSMTT, az $NSC_{élő}$ és az NSC_{elhalt} arányt, a szövetreplikátumok közötti különbséget vagy standard deviációt, a szövetek helyes végső életképességi arányát és a végső előrejelzést;

— a vizsgálatmenet és a vizsgálat meghatározott elfogadhatósági kritériumai tekintetében a vizsgálati vegyi anyaggal/anyagokkal és a kontrollanyagokkal kapott eredmények;

— az egyéb megfigyelt hatások leírása, például a szövetek valamely színes vizsgálati vegyi anyag okozta elszíneződése.

Az eredmények értékelése

Következtetések

SZAKIRODALOM

(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: Egyesült Nemzetek. Elérhető a következő címen:http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) E melléklet B.5., Akut szemirritáció/szemkorrózió című fejezete.

(3) E melléklet B.47., Szarvasmarha-szaruhártya opacitásának és permeabilitásának mérésén alapuló vizsgálati módszer i. a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok és ii. a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására című fejezete.

(4) E melléklet B.48., Izolált csirkeszem vizsgálatán alapuló vizsgálati módszer i. a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok és ii. a besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására című fejezete.

(5) E melléklet B.61., Fluoreszcein-szivárgáson alapuló vizsgálati módszer a szemkorróziót és a súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítására című fejezete.

▼**M8**

(6) E melléklet B.68., Rövid expozíciós idejű *in vitro* vizsgálati módszer i. a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok és ii. a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében besorolást nem igénylő vegyi anyagok azonosítására című fejezete.

(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 2 010,261-266.

(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. Elérhető a következő címen: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. Elérhető a következő címen: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. Elérhető a következő címen: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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for *in vitro* toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In vitro* 27, 1 476-1 488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

▼**M8**

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922-936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In vitro* 15, 115-130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2 610-2 625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Elérhető a következő címen:[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. Elérhető a következő címen: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. 2001. május. Elérhető a következő címen: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, Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

▼M8

1. függelék

Fogalommeghatározások

Pontosság: a vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítőképességét mutatja, és „relevanciájának” egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezés” megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (18).

Referencia-vegyianyag: a vizsgálati vegyi anyaggal való összevetéshez referenciaként használt vegyi anyag. A referencia-vegyianyagnak a következő tulajdonságokkal kell rendelkeznie: i. állandó és megbízható forrás(ok)ból kell származnia, ami lehetővé teszi azonosítását és jellemzését; ii. a vizsgálati vegyi anyag(ok)éhoz hasonló szerkezeti, funkcionális és/vagy kémiai vagy termékosztályba kell tartoznia; iii. ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; iv. rendelkezésre kell állnia az ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és v.. a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

Alulról építkező megközelítés: a szemirritáció vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében feltehetőleg besorolást és címkézést nem igénylő vizsgálati vegyi anyag esetén alkalmazott lépcsőzetes megközelítés, amely a besorolást és címkézést nem igénylő vegyi anyagok (negatív eredmény) más vegyi anyagokhoz (pozitív eredmény) viszonyított meghatározásával kezdődik.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Egyezés: Lásd a „pontosság” meghatározását.

Szaruhártya: a szemgolyó elülső részén az íriszt és a pupillát fedő és a szem belsejébe a fényt bevezető, áttetsző rész.

CV: variációs koefficiens.

Dev: eltérés.

EIT: Eye Irritation Test (szemirritációs vizsgálat).

EURL ECVAM: Állatkísérletek Alternatíváinak Uniós Referencialaboratóriuma.

Szemirritáció: a vizsgálati vegyi anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül teljes mértékben visszafordítható szemelváltozások. Megfelel a „reverzibilis szemkárosodás” fogalmának és az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2. kategóriának.

ET_{50}: az az expozíciós idő, amely alatt egy adott, állandó koncentrációjú referencia-vegyianyag hatására a szövet életképessége 50 %-kal csökken.

Álnegatív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen negatívnak minősített pozitív anyagok részaránya. A vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

Álpozitív arány: a vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen pozitívnak minősített negatív anyagok részaránya. A vizsgálati módszer teljesítőképességének egyik mutatója.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (emberi szaruhártya felhámszövet).

▼M8

HPLC: nagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

IC_{50}: az a referencia-vegyianyag koncentráció, amely meghatározott idejű expozíciót (pl. 30 perces SDS-sel történő kezelést) követően 50 %-kal csökkenti a szövetek életképességét.

Végtelen dózis: az RhCE szövetkonstrukcióra alkalmazott vizsgálati vegyi anyag azon mennyisége, amely meghaladja a felhám felszínének teljes és egyenletes befedéséhez szükséges mennyiséget.

Irreverzibilis szemkárosodás: lásd: „Súlyos szemkárosodás”.

LLOQ: mennyiségi meghatározás alsó határértéke.

LogP: az oktanol/víz megoszlási koefficiens logaritmusa.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

MTT: 3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid; tiazolil kék tetrazólium-bromid.

Negatív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó minta, amelyet egy olyan anyaggal kezelnek, amelyről ismert, hogy a vizsgálati rendszerben nem vált ki pozitív hatást. Ezt a mintát a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt feldolgozzák fel, és e minta alapján határozzák meg a 100 %-os szövet-életképességet.

Nem besorolt: a szemirritáció tekintetében (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 2., és az ENSZ-GHS szerinti 2A. vagy 2B. kategóriába tartozóként) nem besorolt vagy a súlyos szemkárosodás tekintetében (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozóként) nem besorolt vegyi anyagok. Megfelelnek az „ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti kategória nélküli” vegyi anyagoknak.

NSC_{elhalt}: elhalt szöveteken megfigyelt, nem specifikus elszíneződés.

$NSC_{élő}$: élő szöveteken megfigyelt, nem specifikus elszíneződés.

NSMTT: nem specifikus MTT-redukció.

OD: optikai sűrűség.

Teljesítményszabványok: hitelesített, tudományosan megalapozottnak nyilvánított referenciamódszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer által nyújtott teljesítmény elfogadhatóságának igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és iii. a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, hasonló megbízhatósági és pontossági szintek, amelyeket a javasolt vizsgálati módszernek teljesítenie kell a minimális jegyzék referencia-vegyianyagainak felhasználásával történő értékelése során (18).

▼M8

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó minta, amelyet egy olyan anyaggal kezelnek, amelyről ismert, hogy a vizsgálati rendszerben pozitív hatást vált ki. Ezt a mintát a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt dolgozzák fel. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (18).

Megbízhatóság: a vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik (18).

Helyettesítő vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek célja, hogy a veszélyek azonosítására és/vagy kockázatértékelésre rutinszerűen alkalmazott és elfogadott vizsgálatot helyettesítse, és amelyről megállapították, hogy az elfogadott vizsgálattal összehasonlítva, az összes lehetséges vizsgálati helyzetben és vegyi anyag esetében a humán vagy állati egészség egyenértékű vagy jobb védelmét biztosítja (18).

Reprodukálhatóság: ugyanazon vizsgálati vegyi anyag ugyanazon vizsgálati protokollal végzett ismételt vizsgálata során kapott eredmények egyezése (lásd: „megbízhatóság”) (18).

Reverzibilis szemkárosodás: lásd: „Szemirritáció”.

RhCE: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (az emberi szaruhártyahámhoz hasonló rekonstruált felhám).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos negatív kontrollal és egy pozitív kontrollal.

SD: standard deviáció.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vizsgálati vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (18).

▼M8

Súlyos szemkárosodás: a vizsgálati anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a beadást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben. Megfelel az „irreverzibilis szemkárosodás” fogalmának és az „ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriának”.

Szabványműveleti eljárások: formális, írásba foglalt eljárások, amelyek részletesen ismertetik bizonyos rutinjellegű és vizsgálatspecifikus laboratóriumi műveletek végrehajtási módját. Kidolgozásukat a helyes laboratóriumi gyakorlatok teszik szükségessé.

Specificitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vizsgálati vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (18).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálat: egyetlen vizsgálati vegyi anyag egyidejű tesztelése legalább két szövetreplikátumon, a megfelelő szabványműveleti eljárásban meghatározott módon.

Szövet-életképesség: egy sejtpopuláció rekonstruált szöveten belüli teljes aktivitását, például az életfontosságú MTT-festékanyag csökkentésének képességét mérő paraméter, amely a mért végponttól és az alkalmazott vizsgálat felépítésétől függően korrelál az élő sejtek teljes számával és/vagy az életképességükkel.

Felülről építkező megközelítés: a feltehetőleg súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyag esetén alkalmazott lépcsőzetes megközelítés, amely a súlyos szemkárosodást okozó vegyi anyagok (pozitív eredmény) más vegyi anyagokhoz (negatív eredmény) viszonyított meghatározásával kezdődik.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Többszintű vizsgálati stratégia: lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amely a vizsgálati módszereket egymást követően alkalmazza. A vizsgálati vegyi anyagra vonatkozó valamennyi információt áttekintik az egyes szinteken, és a bizonyítékok súlyozásával meghatározzák, hogy a stratégia következő szintjére való továbblépés előtt a veszélyességi osztályozásra vonatkozó döntéshez elegendő információ áll-e rendelkezésre. Ha a vizsgálati vegyi anyag veszélyességi potenciálja/hatáserőssége a rendelkezésre álló információk alapján az adott szinten megállapítható, további vizsgálatra nincs szükség (18).

ULOQ: mennyiségi meghatározás felső határértéke.

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti 1. kategória: lásd: „Súlyos szemkárosodás”.

ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti 2. kategória: lásd: „Szemirritáció”.

ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerint nem besorolt: az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. vagy 2. (illetve az ENSZ-GHS szerinti 2A. vagy 2B.) kategóriába való besorolás követelményeinek nem megfelelő vegyi anyagok. Megfelelnek a „Kategória nélküli” vegyi anyagoknak.

UPLC: ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia.

▼**M8**

UVCB: ismeretlen vagy változó összetételű anyagok, valamint komplex reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

Érvényes vizsgálati módszer: olyan vizsgálati módszer, amely kellően relevánsnak és megbízhatónak minősül egy adott célra, és amely tudományosan megalapozott elveken alapul. Egy-egy vizsgálati módszer abszolút értelemben soha nem érvényes, kizárólag meghatározott céllal összefüggésben az (18).

Validált vizsgálati módszer: olyan vizsgálati módszer, amelynek az adott céllal kapcsolatos relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága validálási vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a validált vizsgálati módszer a javasolt felhasználási célra nem feltétlenül kínál megfelelő pontosságú és megbízhatóságú elfogadható eljárást (18).

VRM: validált referenciamódszer.

VRM1: az 1. validált referenciamódszer az EpiOcular™ EIT vizsgálatra utal.

VRM2: a 2. validált referenciamódszer a SkinEthic™ HCE EIT vizsgálatra utal.

A bizonyítékok súlyozása: a rendelkezésre álló különféle érvek és ellenérvek mérlegelésének folyamata az adott vizsgálati anyag veszélyességével kapcsolatban a megfelelő következtetés levonása és alátámasztása céljából.

▼M8

2. függelék

A SZEMIRRITÁCIÓ VAGY A SÚLYOS SZEMKÁROSODÁS TEKINTETÉBEN BESOROLÁST ÉS CÍMKÉZÉST NEM IGÉNYLŐ VEGYI ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA HITELESÍTETT RHCE VIZSGÁLATOK FŐBB ÖSSZETEVŐI

A vizsgálat összetevői	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Protokollok	Folyadékok (15 percig pipettálható 37 ± 1 °C vagy alacsonyabb hőmérsékleten)	Szilárd anyagok (nem pipettálható)	Folyadékok és viszkózus anyagok (pipettálható)	Szilárd anyagok (nem pipettálható)
A modell felülete	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
A szövetreplikátumok száma	Legalább 2	Legalább 2	Legalább 2	Legalább 2
Színinterferencia előzetes felmérése	50 µl + 1 ml H_2O 60 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett (nem színes vizsgálati vegyi anyagok esetében), vagy 50 µl + 2 ml izopropanol 2–3 óráig szobahőmérsékleten keverve (színes vizsgálati vegyi anyagok esetében) → ha a vizsgálati vegyi anyag OD-értéke 570 ±20 nm-en az izopropanol vagy a víz OD-értékének levonását követően nagyobb mint 0,08 (ami megközelítőleg a negatív kontroll OD-átlagának 5 %-a), élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni.	50 mg + 1 ml H_2O 60 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett (nem színes vizsgálati vegyi anyagok esetében) és/vagy 50 mg + 2 ml izopropanol 2–3 óráig szobahőmérsékleten keverve (színes és nem színes vizsgálati vegyi anyagok esetében) → ha a vizsgálati vegyi anyag OD-értéke 570 ±20 nm-en az izopropanol vagy a víz OD-értékének levonását követően nagyobb mint 0,08 (ami megközelítőleg a negatív kontroll OD-átlagának 5 %-a), élő adaptált kontrollt kell végezni.	10 µl + 90 µl H_2O 30 ±2 percig szobahőmérsékleten (18–28 °C) keverve → ha a vizsgálati vegyi anyag elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni	10 mg + 90 µl H_2O 30 ±2 percig szobahőmérsékleten keverve → ha a vizsgálati vegyi anyag elszíneződik, élő szöveteken adaptált kontrollt kell végezni

▼M8

A vizsgálat összetevői	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Közvetlen MTT-redukáló hatás előzetes felmérése	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml koncentrációjú oldata 180 ±15 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, fagyasztással elölt adaptált kontrollt kell végezni (negatív kontrollként MTT-oldatba helyezett 50 µl steril ionmentesített vizet használnak)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml koncentrációjú oldata 180 ±15 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, fagyasztással elölt adaptált kontrollt kell végezni (negatív kontrollként MTT-oldatba helyezett 50 µl steril ionmentesített vizet használnak)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml koncentrációjú oldata 180 ±15 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, vízben elölt adaptált kontrollt kell végezni (negatív kontrollként MTT-oldatba helyezett 30 µl steril ionmentesített vizet használnak)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml koncentrációjú oldata 180 ±15 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett → ha az oldat színe kékre/lilára vált, vízben elölt adaptált kontrollt kell végezni (negatív kontrollként MTT-oldatba helyezett 30 µl steril ionmentesített vizet használnak)
Előkezelés	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS 30 ± 2 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett, fénytől védve.	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} -mentes DPBS 30 ± 2 percig 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett, fénytől védve.	—	—
A kezelési dózisok és alkalmazásuk	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) kalibrált eszközzel mérve (e.g. egy csapott kanál, amit 50 mg nátrium-kloridra kalibráltak).	10 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Viszkózus anyagokhoz nejlonháló használata ajánlott	30 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Expozíciós idő és hőmérséklet	30 perc (± 2 perc) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett	6 óra (± 0,25 óra) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett	30 perc (± 2 perc) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett	4 óra (± 0,1 óra) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett
Átmosás szobahőmérsékleten	3 alkalommal 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS-ben	3 alkalommal 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS-ben	20 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS	25 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS
Expozíció utáni merítés	12 perc (± 2 perc) szobahőmérsékleten tápoldatban	25 perc (± 2 perc) szobahőmérsékleten tápoldatban	30 perc (± 2 perc) 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH tápoldatban	30 perc (± 2 perc) szobahőmérsékleten tápoldatban

▼M8

A vizsgálat összetevői	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Expozíció utáni inkubáció	120 perc (± 15 perc) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett	18 óra (± 0,25 óra) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett	Nincs	18 óra (± 0,5 óra) tápoldatban 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett
Negatív kontroll	50 µl H_2O Párhuzamosan vizsgálva	50 µl H_2O Párhuzamosan vizsgálva	30 ± 2µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS Párhuzamosan vizsgálva	30 ± 2µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes DPBS Párhuzamosan vizsgálva
Pozitív kontroll	50 µl metil-acetát Párhuzamosan vizsgálva	50 µl metil-acetát Párhuzamosan vizsgálva	30 ± 2µl metil-acetát Párhuzamosan vizsgálva	30 ± 2µl metil-acetát Párhuzamosan vizsgálva
MTT-oldat	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT inkubációs idő és hőmérséklet	180 perc (± 15 perc) 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett	180 perc (± 15 perc) 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett	180 perc (± 15 perc) 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett	180 perc (± 15 perc) 37 ±2 °C, 5 ±1 % CO_2, ≥ 95 % RH mellett
Extraháló oldószer	2 ml izopropanol (kinyerés az inzert tetejéről és aljáról a szövet átszúrásával)	2 ml izopropanol (kinyerés az inzert aljáról a szövet átszúrásával)	1,5 ml izopropanol (kinyerés az inzert tetejéről és aljáról)	1,5 ml izopropanol (kinyerés az inzert aljáról)
Extrakciós időtartam és hőmérséklet	2–3 óra rázatással (~120 rpm) szobahőmérsékleten vagy éjszaka 4–10 °C-on	2–3 óra rázatással (~120 rpm) szobahőmérsékleten vagy éjszaka 4–10 °C-on	4 óra rázatással (~120 rpm) szobahőmérsékleten vagy rázatás nélkül legalább egész éjszaka 4–10 °C-on	Legalább 2 óra rázatással (~120 rpm) szobahőmérsékleten
OD leolvasás	570 nm (550–590 nm) referenciaszűrő nélkül	570 nm (550–590 nm) referenciaszűrő nélkül	570 nm (540–600 nm) referenciaszűrő nélkül	570 nm (540–600 nm) referenciaszűrő nélkül
Szövet minőség-ellenőrzése	Kezelés 100 µl 0,3 térfogatszázalékos Triton X-100-zal 12,2 perc ≤ ET_{50} ≤ 37,5 perc	Kezelés 100 µl 0,3 térfogatszázalékos Triton X-100-zal 12,2 perc ≤ ET_{50} ≤ 37,5 perc	30 perces kezelés nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	30 perces kezelés nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

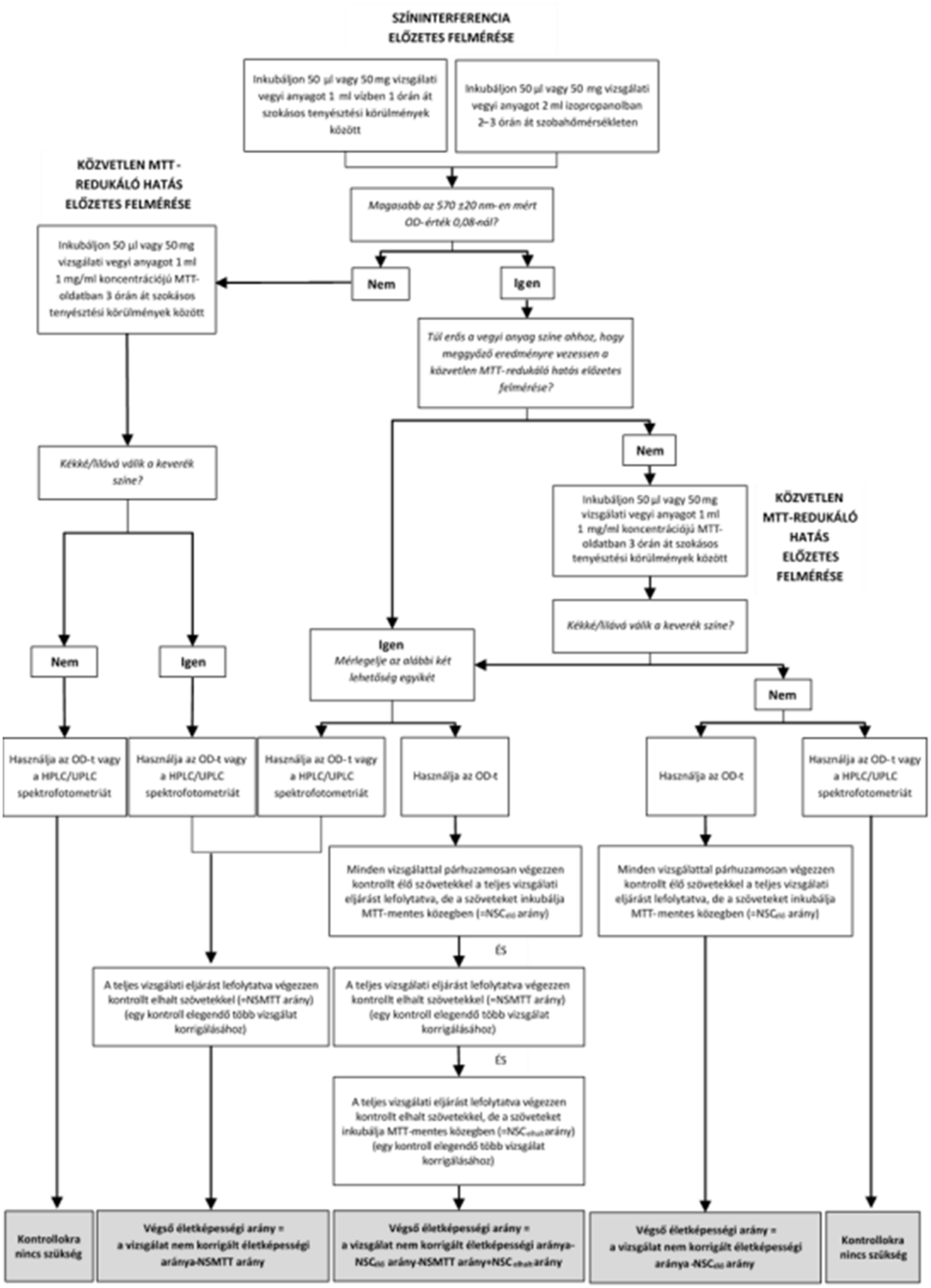
▼M8

A vizsgálat összetevői	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Elfogadhatósági kritériumok	1. A negatív kontrollal kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének 0,8-nál nagyobbnak és 2,5-nél kisebbnek kell lennie 2. A pozitív kontrollal 30 percen át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem érheti el az 50 %-ot 3. A két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem érheti el a 20 %-ot.	1. A negatív kontrollal kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének 0,8-nál nagyobbnak és 2,5-nél kisebbnek kell lennie 2. A pozitív kontrollal 6 órán át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem érheti el az 50 %-ot 3. A két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem érheti el a 20 %-ot.	1. A negatív kontrollal kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének 1,0-nál nagyobbnak, de legfeljebb 2,5-nek kell lennie 2. A pozitív kontrollal 30 percen át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége nem haladhatja meg a 30 %-ot 3. A két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem érheti el a 20 %-ot.	1. A negatív kontrollal kezelt szövetreplikátumok átlagos OD-értékének 1,0-nál nagyobbnak, de legfeljebb 2,5-nek kell lennie 2. A pozitív kontrollal 4 órán át kezelt szövetreplikátumok átlagos, a negatív kontroll százalékában kifejezett életképessége legfeljebb 20 % lehet 3. A két szövetreplikátum életképessége közötti különbség nem érheti el a 20 %-ot.

▼**M8**

3. függelék

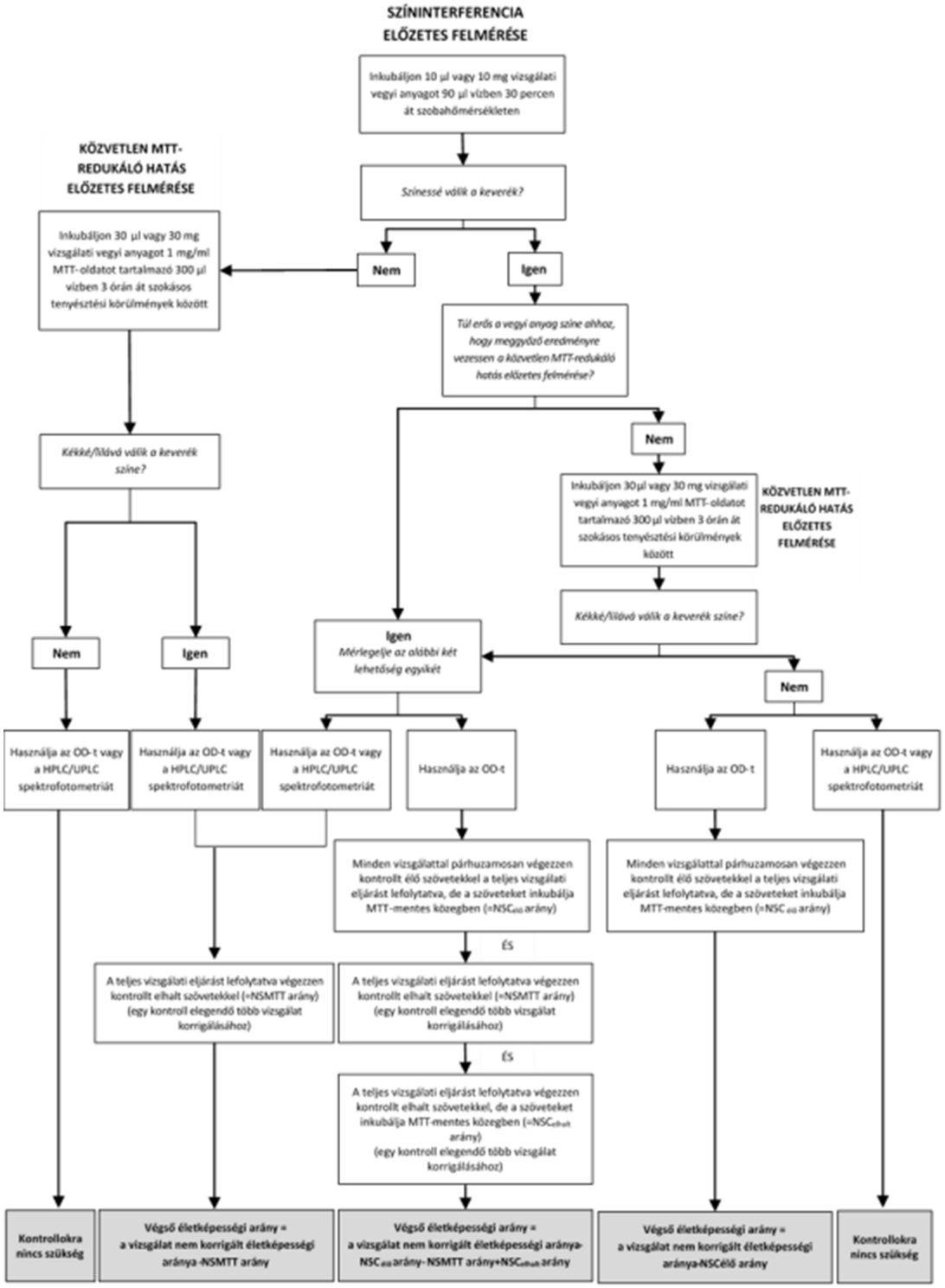
A VRM1 SZABVÁNYMŰVELETI ELJÁRÁSÁN ALAPULÓ SZEMLÉLTETŐ FOLYAMATÁBRA ARRÓL, HOGYAN LEHET AZONOSÍTANI ÉS KEZELNI A KÖZVETLEN MTT-REDUKÁLÓ ÉS/VAGY SZÍNINTERFERENCIÁT OKOZÓ VEGYI ANYAGOKAT



▼**M8**

4. függelék

A VRM2 SZABVÁNYMŰVELETI ELJÁRÁSÁN ALAPULÓ SZEMLÉLTETŐ FOLYAMATÁBRA ARRÓL, HOGYAN LEHET AZONOSÍTANI ÉS KEZELNI A KÖZVETLEN MTT-REDUKÁLÓ ÉS/VAGY SZÍNINTERFERENCIÁT OKOZÓ VEGYI ANYAGOKAT



▼**M8**

5. függelék

AZ RHCE SZÖVETKONSTRUKCIÓKBÓL KIVONT MTT-FORMAZÁN MÉRÉSÉRE HASZNÁLT HPLC/UPLC SPEKTROFOTOMETRIÁS RENDSZER MINŐSÍTÉSÉNEK FŐBB PARAMÉTEREI ÉS ELFOGADHATÓSÁGI KRITÉRIUMAI

Paraméter	Az FDA-iránymutatás szerinti protokoll (36) (38)	Elfogadhatósági kritériumok
Szelektivitás	Izopropanol elemzése, élő vakpróba (nem kezelt élő RhCE-szövetekből kivont izopropanol), elhalt vakpróba (nem kezelt elhalt RhCE-szövetekből kivont izopropanol), és egy festék (pl. metilénkék) elemzése	$\text{Terület}_{\text{interferencia}} \leq \text{Terület}_{\text{AMHÉ}}$ ([1]) 20 %-a
Precizitás	Minőség-ellenőrzések (vagyis MTT-formazán 1,6 μg/ml, 16 μg/ml és 160 μg/ml mellett) izopropanolban (n=5)	Variációs koefficiens ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a
Pontosság	Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Eltérési arány ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a
Mátrixhatás	Minőség-ellenőrzés élő vakpróbán (n=5)	85 % ≤ Mátrixhatás % ≤ 115 %
Átvitel	Izopropanol elemzése egy FMHÉ ([2]) szabvány után	$\text{Terület}_{\text{interferencia}} \leq \text{Terület}_{\text{AMHÉ}}$ 20 %-a
Megismételhetőség (napon belüli)	3 független kalibrációs görbe (izopropanolba helyezett MTT-formazán 6 egymás utáni 1/3-os hígítása kezdve a FMHÉ-nél, vagyis 200 μg/ml-nél); Minőség-ellenőrzés izopropanolban (n=5)	Kalibrációs görbék: Eltérési arány ≤ 15 % vagy ≤ az AMHÉ 20 %-a Minőség-ellenőrzések: Eltérési arány ≤ 15 % és variációs koefficiens ≤ 15 %
Megismételhetőség (napok közötti)	1. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 2. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3) 3. nap: 1 kalibrációs görbe és minőség-ellenőrzések izopropanolban (n=3)	
Az MTT-formazán rövid távú stabilitása az RhCE szövetkivonatban	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és 24 órás szobahőmérsékleten való tárolás után	Eltérési arány ≤ 15 %
Az MTT-formazán hosszú távú stabilitása az RhCE szövetkivonatban, ha szükséges	Minőség-ellenőrzések élő vakpróbán (n=3) a készítés napján és több napon keresztüli -20 °C-on való tárolás után	Eltérési arány ≤ 15 %

([1]) LLOQ: mennyiségi meghatározás alsó határértéke, amely 1–2 %-os szöveti életképességet takar, vagyis 0,8 μg/ml.
([2]) ULOQ: mennyiségi meghatározás felső határértéke, amely legalább kétszer akkora, mint a negatív kontroll izopropanolban várható legmagasabb MTT-formazán koncentrációja (~70 μg/ml a VRM-ben), vagyis 200 μg/ml.

▼M8

B.70. A VEGYI ANYAGOK ÖSZTROGÉNRECEPTOROKHOZ KÖTÉSI AFFINITÁSÁNAK HUMÁN REKOMBINÁNS ÖSZTROGÉNRECEPTORRAL (hrER) TÖRTÉNŐ ÉSZLELÉSÉRE SZOLGÁLÓ *IN VITRO* VIZSGÁLATOK

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

Az OECD teljesítményalapú vizsgálati iránymutatása

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 493. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A 493. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás (PBTG) az ösztrogénreceptorokhoz kötési affinitást mutató anyagok észlelésére szolgáló humán rekombináns *in vitro* vizsgálatok (humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatok) módszertanát ismerteti. Az iránymutatás az ösztrogénreceptort (vagyis az ERα-t) kötő anyagok azonosítását lehetővé tévő két, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszert tartalmaz, és a veszély értékelésére szolgáló új és átdolgozott vizsgálati módszerek validálásáról és nemzetközi elfogadásról szóló OECD-irányelvben (1) megfogalmazott validálási elvekkel összhangban megkönnyíti az új – hasonló vagy módosított – vizsgálati módszerek kidolgozását. E teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás alapjául szolgáló, teljes körűen validált (a 2. és a 3. függelékben ismertetett) vizsgálati referenciamódszerek a következők:

— a teljes hosszúságú humán rekombináns ERα használatán alapuló Freyberger-Wilson-féle (FW) *in vitro* ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat (2), valamint

— a Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) által kidolgozott *in vitro* ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat, amely humán rekombináns fehérje ligandumkötő-doménjének használatán alapul (2).

A rendelkezésre álló teljesítményszabványok (3) megkönnyítik az ugyanezt a veszélyes végpontot célzó hasonló vizsgálati módszerek kidolgozását és validálását, és lehetővé teszik a 493. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás időben történő módosítását, hogy az új, hasonló vizsgálatokat be lehessen építeni az átdolgozott iránymutatásba. Hasonló vizsgálatok azonban csak azután foglalhatók bele az iránymutatásba, hogy az OECD felülvizsgálta és jóváhagyta a teljesítményszabványok teljesülését. A 493. vizsgálati iránymutatás alá tartozó vizsgálatok egységesen felhasználhatók az OECD-tagállamok ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatok eredményeire vonatkozó követelményeinek kialakításához, ugyanakkor biztosítják az adatok kölcsönös elfogadásának előnyeit.

A vizsgálati módszerhez tartozó vizsgálatok háttere és elvei

2. Az OECD 1998-ban kiemelt fontosságú tevékenységet indított az endokrin rendszert esetlegesen károsító vegyi anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálata, valamint új vizsgálati iránymutatások kidolgozása érdekében. Az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére szolgáló fogalmi keretét 2012-ben átdolgozták. Az elvi keretrendszer eredeti és átdolgozott változatát mellékletként csatolták az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok értékelésére vonatkozó szabványosított vizsgálati iránymutatásokról szóló iránymutatáshoz (4). Az elvi keretrendszer öt szintet határoz meg, amelyek mindegyike a biológiai komplexitás egy különálló szintjének felel meg. Az e vizsgálati módszer keretében ismertetett ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatok a 2. szinten helyezkednek el, amely magában foglalja „*a kiválasztott endokrin mechanizmus(ok)ról/útvonal(ak)ról adatokat szolgáltató in vitro vizsgálatokat*”. Ez a vizsgálati módszer olyan *in vitro* receptorkötési vizsgálatokhoz használatos, amelyek célja a humán ösztrogénreceptor alfa (ERα) ligandumainak azonosítása.

▼M8

3. Egyértelműen bizonyították az *in vitro* ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat biológiai funkciók terén betöltött jelentőségét. Az ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatokat abból a célból hozták létre, hogy beazonosítsák az ösztrogén hormon szignalizációs útvonalát potenciálisan zavaró vegyi anyagokat, és az elmúlt két évtized során széles körben alkalmazták őket az ösztrogénreceptor szöveti eloszlásának jellemzésére, valamint az ösztrogénreceptor agonistáinak/antagonistáinak azonosítására. Ezek a vizsgálatok az ösztrogén szignalizációs útvonalának első lépését jelentő ligandum-receptor kölcsönhatással foglalkoznak, ami kulcsfontosságú szerepet tölt be minden gerinces élőlény szaporodási funkciójában.

4. Az ösztrogének és az ösztrogénreceptorok kölcsönhatása befolyásolhatja az ösztrogénhatásra érzékeny gének transzkripcióját és okozhat nem-genomiális hatásokat, amelyek többek között a sejtosztódás, a normál magzati fejlődés és a szaporodási funkciók sejtszintű előidézéséhez vagy gátlásához vezethetnek (5) (6) (7). A normál ösztrogénrendszerek zavara károsan befolyásolhatja a normál egyedfejlődést (ontogenezist), a reprodukciós egészséget és a reproduktív rendszer integritását. A nem megfelelő ösztrogénreceptor szignál olyan hatásokat válthat ki, mint a hormonfüggő daganatos betegségek megemelkedett kockázata, a termékenység csökkenése, valamint a magzati növekedési és fejlődési rendellenességek (8).

5. Az *in vitro* kötési vizsgálatok egy anyagnak a specifikus receptor ligandumkötő helyével történő közvetlen kölcsönhatásán alapulnak, ami a géntranszkripciót szabályozza. A humán rekombináns ösztrogénreceptor alfa (hrERα) kötési vizsgálat főként a radioaktívan jelölt ligandum (a [^{3}H]-17β-ösztradiol) ösztrogénreceptorhoz történő kötését méri a vizsgálati vegyi anyag (vagyis a kompetítor) növekvő koncentrációjának jelenlétében. Az ösztrogénreceptorok iránt nagy affinitást mutató vizsgálati vegyi anyagok alacsonyabb koncentrációban versenyeznek a radioaktívan jelölt ligandummal azokhoz a vegyi anyagokhoz képest, amelyek kisebb affinitást mutatnak a receptor iránt. A vizsgálat két fő összetevőből áll: egy telítési kötési kísérletből, amelynek során meghatározzák a receptor-ligandum kölcsönhatás paramétereit és dokumentálják az ösztrogénreceptor-specifikusságot, majd egy kompetitív kötési kísérletből, amely jellemzi a vizsgálati vegyi anyag és a radioaktívan jelölt ligandum ER-kötőhelyekért folytatott vetélkedését.

6. A CERI és a Freyberger–Wilson kötési vizsgálat validálási tanulmánya igazolta, hogy e vizsgálatok tervezett felhasználásuk tekintetében relevánsak és megbízhatóak (2).

7. A vizsgálati módszerben használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A receptorkötési vizsgálatok alkalmazási területe és korlátai

8. E vizsgálatokat szűrési és rangsorolási célra ajánlják, ugyanakkor a molekuláris kiváltó eseményre vonatkozólag is képesek adatokat szolgáltatni, amelyek felhasználhatók egy bizonyítékok súlyozásán (WoE) alapuló megközelítésben. A vizsgálatok tárgya az ösztrogénreceptor α ligandumkötő doménjén *in vitro* létrejövő kémiai kötés. Ezért az eredményekből nem lehet közvetlenül következtetni az intakt *in vivo* endokrin rendszerben megvalósuló összetett jelátvitelre és szabályozásra.

▼**M8**

9. A természetes ligandum, a 17β-ösztradiol megkötése az első lépése annak a molekuláris eseménysorozatnak, amely aktiválja a célgének transzkripcióját, majd végül egy fiziológiai változást idéz elő (9). Tehát az ösztrogénreceptor α ligandumkötő doménjéhez való kötést az ösztrogénreceptorok által kiváltott endokrin zavarok (ED) egyik fő mechanizmusaként tartják számon, bár más mechanizmusok is okozhatnak endokrin zavarokat, többek között i. az ösztrogénreceptor α ligandumkötő régióján kívüli részeivel létrejött kölcsönhatások, ii. az ösztrogén jelátvitel szempontjából releváns más receptorokkal, mint pl. az ösztrogénreceptor β-val, az ösztrogénreceptorokkal kapcsolt g-fehérjékkel, az endokrin rendszeren belüli más receptorokkal és enzimrendszerekkel létrejött kölcsönhatások, iii. hormonszintézis, iv. a hormonok metabolikus aktiválása és/vagy inaktiválása, v. hormonok elszállítása a célszövetekhez és vi. hormonok kiürülése a szervezetből. E hatásmechanizmusokkal a vizsgálati módszer alá tartozó vizsgálatok egyike sem foglalkozik.

10. E vizsgálati módszer célja, hogy felmérje az anyagok humán ösztrogénreceptor α-hoz való kötődési képességét, és nem teszi lehetővé az ösztrogénreceptor α agonistái és antagonistái közötti különbségtételt. E vizsgálatok nem foglalkoznak továbbá az eseménysorozat későbbi történéseivel, például a géntranszkripcióval vagy a fiziológiai változásokkal. Mivel a validálás során csak különálló, egy komponensű anyagokat használtak, a vizsgálat keverékekre való alkalmazhatósága nem vetődött fel. Mindazonáltal a vizsgálatok elvileg alkalmazhatók több összetevőből álló anyagok és keverékek vizsgálatára. A vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

11. A sejtmentes receptorrendszerek nem rendelkeznek saját metabolikus képességgel, metabolikus enzimrendszerekkel kombinált használatukat pedig nem validálták. Elképzelhető, hogy kidolgozható lenne egy metabolikus aktivitást magában foglaló vizsgálat, ez azonban további validálást tenne szükségessé.

12. Azok a vegyi anyagok, amelyek denaturálhatják a fehérjét (vagyis a receptor fehérjét), például a felületaktív anyagok, vagy amelyek módosíthatják a vizsgálati puffer pH-értékét, nem vizsgálhatók, vagy csak olyan koncentrációkban vizsgálhatók, amelyek nem idéznek elő ilyen hatásokat. Ezen túlmenően egy adott vizsgálati vegyi anyag tesztelhető koncentrációtartományát a vizsgálati pufferben való oldhatósága is korlátozza.

13. Az 1. táblázat tájékoztatási céllal ismerteti az e vizsgálati módszer által leírt mindkét teljes körűen validált vizsgálatban tesztelt 24 anyagra vonatkozó eredményeket. A szóban forgó anyagok közül 17-et ösztrogénreceptorhoz kötődő anyagként határoztak meg, 6-ot pedig nem kötődőnek minősítették a közzétett vizsgálati jelentésnek, többek között az *in vitro* ösztrogénreceptor transzkripciós aktivációs vizsgálatok és/vagy az uterotrofikus vizsgálat alapján (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Az 1. táblázatban összefoglalt adatok vonatkozásában 10^{-4} M koncentrációig szinte 100 %-os egyezés mutatható ki a két vizsgálat között valamennyi anyag besorolása tekintetében, és minden anyagot helyesen osztályoztak ösztrogénreceptorhoz kötődő és nem kötődő anyagként. Erről az anyagcsoportról, valamint a validálási tanulmányok során az ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatokban tesztelt egyéb anyagokról a humán ösztrogénreceptorhoz-kötési vizsgálat teljesítményszabványai nyújtanak bővebb tájékoztatást (3), lásd a 2. függeléket (1., 2., és 3. táblázat).

▼M8

1. táblázat

A Freyberger–Wilson (FW) és a CERI humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat során tesztelt anyagok ösztrogénreceptorhoz kötődő és nem kötődő anyagként való besorolása a várt válasszal való összevetésben

	Az anyag neve	CAS-szám	Várt válasz	FW vizsgálat		CERI vizsgálat		MESH kémiai osztály	Termékosztály
				Koncentráció-tartomány (M)	Besorolás	Koncentráció-tartomány (M)	Besorolás		
1	17β-ösztradiol	50-28-2	*Kötődő*	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Kötődő	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
2	Noretinodrel	68-23-5	*Kötődő*	3×10^{-9}–30×10^{-4}	Kötődő	3×10^{-9}–30×10^{-4}	Kötődő	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
3	Noretindron	68-22-4	*Kötődő*	3×10^{-9}–30×10^{-4}	Kötődő	3×10^{-9}–30×10^{-4}	Kötődő	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
4	Di-*n*-butil-ftalát	84-74-2	*Nem kötődő* (*)	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Nem kötődő (**) (+)	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Nem kötődő (**) (+)	Szénhidrogén (ciklikus), észter	Lágyítószer, köztes vegyi anyag
5	Dietilstilbösztrol	56-53-1	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szénhidrogén (ciklikus), fenol	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
6	17α-etinilösztradiol	57-63-6	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
7	Mezo-hexestrol	84-16-2	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szénhidrogén (ciklikus), fenol	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
8	Geniszten	446-72-0	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szénhidrogén (heterociklikus), flavonid	Természetes termék

▼M8

	Az anyag neve	CAS-szám	Várt válasz	FW vizsgálat		CERI vizsgálat		MESH kémiai osztály	Termékosztály
				Koncentráció-tartomány (M)	Besorolás	Koncentráció-tartomány (M)	Besorolás		
9	Equol	531-95-3	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Fitoösztrogén metabolit	Természetes termék
10	Butil-parabén (nátrium-butil-4-hidroxi-benzoát)	94-26-8	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Parabén	Tartósítószer
11	Nonilfenol (keverék)	84852-15-3	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Alkil-fenol	Köztes vegyület
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szerves klór	Rovarölő szer
13	Kortikoszteron	50-22-6	*Nem kötődő* (*)	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Nem kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Nem kötődő	Szteroid	Természetes termék
14	Zearalenon	17924-92-4	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szénhidrogén (heterociklikus), lakton	Természetes termék
15	Tamoxifén	10540-29-1	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szénhidrogén (ciklikus)	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
16	5α-dihidrotesztoszteron	521-18-6	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szteroid, nem fenolos	Természetes termék
17	Biszfenol-A	80-05-7	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Fenol	Köztes vegyi anyag
18	4-n-heptilfenol	1987-50-4	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kétértelmű ([a])	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Alkil-fenol	Köztes

▼M8

	Az anyag neve	CAS-szám	Várt válasz	FW vizsgálat		CERI vizsgálat		MESH kémiai osztály	Termékosztály
				Koncentráció-tartomány (M)	Besorolás	Koncentráció-tartomány (M)	Besorolás		
19	Kepone (klórdekon)	143-50-0	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Szénhidrogén (halogénezett)	Peszticid
20	Benz(a)antracén	56-55-3	*Nem kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Nem kötődő ([b])	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Nem kötődő ([b])	Aromás szénhidrogén	Köztes
21	Enterolakton	78473-71-9	*Kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Kötődő	Fitoösztrogén	Természetes termék
22	Progeszteron	57-83-0	*Nem kötődő* (*)	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Nem kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Nem kötődő	Szteroid	Természetes termék
23	Oktil-trietoxi-szilán	2943-75-1	*Nem kötődő*	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Nem kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Nem kötődő	Szilán	Felületmódosító
24	Atrazin	1912-24-9	*Nem kötődő* (*)	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Nem kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Nem kötődő	Heterociklikus vegyület	Gyomirtó szer

(*) Oldhatósági határérték $< 1 \times 10^{-4}$ M.

(**) A di-n-butil-ftalát (DBP) nem kötődő anyagként való alkalmazása és besorolása 10^{-4} M koncentrációig történő vizsgálatán alapul, mivel az elővalidálási tanulmányok során néhány laboratóriumban 10^{-3} M koncentrációban oldhatatlannak bizonyult (pl. zavarosságot mutatott).

([+]) A validálási tanulmány során a di-*n*-butil-ftalátot (DBP) kódolt vizsgálati anyagként tesztelték, 10^{-3} M koncentrációig. E feltételek mellett bizonyos laboratóriumok a legmagasabb koncentrációnál (10^{-3} M) a radioaktív ligandum kötődésének csökkenését figyelték meg és/vagy kétértelmű görbeillesztést tapasztaltak. E vizsgálatmenetek tekintetében a DBP a CERI vizsgálatot alkalmazó öt laboratórium közül háromban, és a Freyberger–Wilson vizsgálatot alkalmazó hat laboratórium közül ötben „kétértelmű” vagy „kötődő” besorolást kapott (lásd a (2) referencia IV.B.3a,b és VI.A részeit).

([a]) Besorolása nem egyezik a várt besorolással. Mivel a 4-*n*-heptilfenolt öt laboratórium közül három „kétértelműnek” vagy „nem kötődőnek” minősítette, az átlag alapján kétértelmű besorolást kapott. Az alaposabb vizsgálat feltárta, hogy ennek oka a vegyi anyag oldhatósági korlátaiban keresendő, amelyek megakadályozták a teljes kötési görbe létrehozását.

([b]) A benz(a)antracén a validálási tanulmány során új besorolást kapott, nem kötődő (vagyis negatív) anyagként azonosították a közzétett szakirodalom alapján, amely igazolta, hogy az anyag *in vitro* megfigyelt ösztrogénhatású aktivitása (16) elsősorban metabolikus aktiválásától függ(17)(18). Az anyag enzimatikus metabolikus aktiválása nem várható az ezen, laboratóriumok közötti intervalidálási tanulmány keretében alkalmazott sejtmentes humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatokban. Ezért a Freyberger–Wilson és a CERI vizsgálat kísérleti körülményei között történő alkalmazása szempontjából az anyag helyes besorolása a „nem kötődő”.

▼M8

A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI

A vizsgálat alapvető összetevői

14. Ez a vizsgálati módszer olyan vizsgálatokra vonatkozik, amelyek ösztrogénreceptort és a receptorhoz kellően nagy affinitással kötődő ligandumot alkalmaznak, amely a vizsgálat során markerként/nyomjelzőként használható, és a vizsgálati vegyi anyagok növekvő koncentrációjával leszorítható. A kötési vizsgálatok az alábbi két fő összetevőből állnak: 1) telítési kötés és 2) kompetitív kötés. A telítési kötési vizsgálat során ellenőrzik a receptor preparátumok specifikusságát és aktivitását, a kompetitív kötési kísérlet során pedig értékelik a vizsgálati vegyi anyagok humán ösztrogénreceptorhoz való kötési képességét.

Kontrollok

15. Meg kell határozni, hogy mi alapján javasolják a párhuzamosan vizsgált referenciaösztrogént és kontrollanyagokat. Az egyidejűleg elvégzett kontrollok (oldószeres (vivőanyagos), pozitív (ösztrogénreceptorhoz kötődő; erős és gyenge affinitással rendelkező) és negatív (nem kötődő) kontrollok) arra szolgálnak, hogy igazolják a vizsgálat tesztkörülmények közötti megfelelő működését, és megteremtsék az alapját az egyes kísérletek összevetésének; általában részét képezik a szóban forgó kísérlet elfogadhatósági kritériumainak (1). Minden vizsgálatmenetben ugyanazon a lemezen vizsgálni kell a referenciaösztrogén teljes koncentrációgörbéjét és a kontrollanyagokat (vagyis a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Az összes többi lemeznek az alábbiakat kell tartalmazniuk: 1) az E2 és a gyengén kötődő anyag magas koncentrációját (amely megközelítőleg teljesen leszorítja a radioaktívan jelölt ligandumot) és közepes koncentrációját (amely körülbelül az IC_{50} hatásának felel meg), három ismétlésben; 2) az oldószer és a nem specifikus kötődés vizsgálatát, három-három ismétlésben.

Standard minőség-ellenőrzési eljárások

16. El kell végezni az egyes vizsgálatokhoz meghatározott standard minőségellenőrzési eljárásokat annak érdekében, hogy garantálni lehessen a receptorok aktivitását, a vegyi anyag megfelelő koncentrációértékeit, a tűréshatárok többszöri ismétlésen keresztüli stabilitását, valamint a várt ösztrogénreceptor-kötési válaszreakciók biztosításának hosszú távú képességét.

A laboratórium jártasságának igazolása

17. Mielőtt ismeretlen vegyi anyagokat tesztelnének az e vizsgálati módszerhez kapcsolódó bármely vizsgálattal, a laboratóriumoknak igazolniuk kell az adott vizsgálat alkalmazásában szerzett jártasságukat azáltal, hogy végrehajtanak az ösztrogénreceptor preparátum specifikusságának és aktivitásának ellenőrzésére szolgáló telítési vizsgálatokat, valamint a referenciaösztrogént és a kontrollokat (gyengén kötődő és nem kötődő anyagokat) is tesztelő kompetitív kötési vizsgálatokat. A laboratóriumoknak adatbázist kell létrehozniuk a referenciaösztrogénnel és a kontrollanyagokkal különböző napokon végzett 3–5 független kísérletből származó eredményekből. Ezek a kísérletek teremtik meg az alapját annak, hogy a laboratóriumok a referenciaösztrogénre és a kontrollanyagokra vonatkozólag dokumentált adatokkal rendelkezzenek, amelyeket a jövőbeni vizsgálatmenetek során felhasználnak a vizsgálat elfogadhatóságának értékeléséhez.

18. A vizsgálati rendszer reakcióképességét a 2. táblázatban felsorolt jártassági tesztanyagok vizsgálata révén is meg kell erősíteni. A jártassági tesztanyagok jegyzéke az ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatok teljesítményszabványaiban (3) megadott referenciaanyagok egy csoportjából tevődik össze. Ezek az anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők, olyan kémiai osztályokat képviselnek, amelyeknél gyakori az ösztrogénreceptor-kötési aktivitás, a várt ösztrogénreceptor-kötési potenciál megfelelő (erőstől a gyengéig terjedő) tartományát képviselik, és vannak közöttük nem kötődő (azaz negatív) anyagok. Az egyes jártassági tesztanyagok vizsgált koncentrációértékeinek le kell fedniük a 2. táblázatban szereplő tartományt. Minden anyag esetében legalább három kísérletet kell végezni, és az eredményeknek összhangban kell lenniük a vegyi anyag várt aktivitásával. Az összes kísérletet független módon (vagyis a receptor, a vizsgálati vegyi anyagok és a reagens frissen készített oldataival) kell végrehajtani, minden egyes koncentrációértéket három ismétlésben vizsgálva. A jártasság az egyes jártassági tesztanyagok megfelelő (pozitív/negatív) osztályba sorolásával igazolható. A vizsgálatok elsajátítása során a jártassági vizsgálatot minden szakembernek el kell végeznie.

▼M8

2. táblázat

A humán ösztrogénreceptor kompetitív kötési vizsgálatokban használt kontrollanyagok és jártassági tesztanyagok jegyzéke ([1])

Szám	Az anyag neve	CAS-szám ([2])	Várt válasz ([3]) ([4])	Vizsgálati koncentrációtartomány (M)	MeSH kémiai osztály ([5])	Termékosztály ([6])
Kontrollanyagok (referenciaösztrogén, gyengén kötődő és nem kötődő anyag)						
1	17-β-ösztradiol	50-28-2	Kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
2	Noretinodrel (vagy) Noretindron	68-23-5 (vagy) 68-22-4	Kötődő	3×10^{-9}–30×10^{-6}	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
3	Oktil-trietoxi-szilán	2943-75-1	Nem kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Szilán	Felületmódosító
Jártassági tesztanyagok ([6])						
4	Dietilstilbösztrol	56-53-1	Kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Szénhidrogén (ciklikus), fenol	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
5	17α-etinilösztradiol	57-63-6	Kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Szteroid	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
6	mezo-Hexestrol	84-16-2	Kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Szénhidrogén (ciklikus), fenol	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
7	Tamoxifén	10540-29-1	Kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Szénhidrogének (ciklikus)	Gyógyszer, állatgyógyászati hatóanyag
8	Geniszten	446-72-0	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Heterociklikus vegyület, flavonid	Természetes termék
9	Biszfenol-A	80-05-7	Kötődő	1×10^{-10}–1×10^{-3}	Fenol	Köztes vegyi anyag
10	Zearalenon	17924-92-4	Kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-3}	Heterociklikus vegyület, lakton	Természetes termék

▼M8

Szám	Az anyag neve	CAS-szám ([2])	Várt válasz ([3]) ([4])	Vizsgálati koncentrációtartomány (M)	MeSH kémiai osztály ([5])	Termékosztály ([6])
11	Butil-parabén	94-26-8	Kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-3}	Karbonsav, fenol	Tartósítószer
12	Atrazin	1912-24-9	Nem kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-6}	Heterociklikus vegyület	Gyomirtó szer
13	Di-n-butil-ftalát (DBP) ([7])	84-74-2	Nem kötődő ([8])	1×10^{-10}–1×10^{-4}	Szénhidrogén (ciklikus), észter	Lágyítószer, köztes vegyi anyag
14	Kortikoszteron	50-22-6	Nem kötődő	1×10^{-11}–1×10^{-4}	Szteroid	Természetes termék

([1]) Amennyiben egy adott jártassági tesztanyag kereskedelmi forgalmazása megszűnik, akkor használható helyette egy ösztrogénreceptor-kötés tekintetében azonos besorolású, hasonló potenciállal rendelkező, azonos kémiai osztályba tartozó anyag.

([2]) Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám.

([3]) Az anyagok ERα-hoz kötődő és nem kötődő kategóriába sorolására a CERI és a Freyberger–Wilson humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat validálási tanulmányának keretében került sor (2).

([4]) Az ösztrogénreceptor-kötési aktivitás besorolásának alapját az ösztrogénreceptor-kötési és transzaktiválási vizsgálatok felülvizsgálatára vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumok (9), valamint a hivatkozásokban szereplő, közzétett és átdolgozott tanulmányokból nyert empirikus adatok és egyéb információk képezik (10) (11) (12) (13) (14) (15).

([5]) Az anyagok egy vagy több kémiai osztályba sorolása az Egyesült Államok nemzetközileg elismert szabványosított osztályozási rendszere, a Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Az anyagok egy vagy több termékosztályba sorolása az Egyesült Államok Medicine's Hazardous Substances Database nemzeti könyvtára alapján történt (elérhető a következő címen: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

([7]) A legfeljebb 10^{-4} M koncentrációig vizsgált DBP használható alternatív nem kötődő kontrollanyagként.

([8]) Az anyag oldhatósági határértéke 10^{-4} M. A di-n-butil-ftalát (DBP) nem kötődő anyagként való alkalmazása és besorolása 10^{-4} M koncentrációig történő vizsgálatán alapul, mivel az elővalidálási tanulmányok során néhány laboratóriumban 10^{-3} M koncentrációban oldhatatlannak bizonyult (pl. zavarosságot mutatott).

▼M8

A vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági vizsgálata és koncentrációtartományuk behatárolása

19. Előzetes vizsgálatot kell végezni az egyes vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági határértékének meghatározására, valamint a vizsgálat során alkalmazandó megfelelő koncentrációtartomány megállapítására. A vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági határértékét először oldószerben kell meghatározni, majd a vizsgálati körülmények mellett meg kell erősíteni. A vizsgálat során tesztelt végső koncentráció nem haladhatja meg az 1 mM-t. A koncentrációtartomány-behatároló vizsgálatnak magában kell foglalnia egy oldószeres kontrollt és a legmagasabb elfogadható koncentrációtól (pl. 1 mM, illetve az oldhatósági határértéktől függően ennél alacsonyabb koncentrációtól) induló, nyolc koncentrációból álló logaritmikus hígítási sorozatot, az esetlegesen tapasztalt zavarosságot vagy kicsapódást fel kell jegyezni. A második és a harmadik kísérlet koncentrációértékeit úgy kell megválasztani, hogy jobban illeszkedjenek a koncentráció-válasz görbéhez.

A vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumai

20. A vizsgálatmenetek elfogadására vagy elvetésére a minden kísérletben vizsgált referenciaösztrogén és kontrollanyagok eredményeinek értékelése alapján kerül sor. Először is, az 1. lemez tekintetében minden kísérlet referenciaként szolgáló kontrollanyagainak görbeillesztési paramétereiből (pl. az IC_{50} és a Hill-meredekség) létrehozott teljes koncentrációgörbéknek meg kell felelniük a teljesítménymutatóknak, amit a CERI és a Freyberger–Wilson vizsgálat protokolljában (2. és 3. függelék) feltüntetett eredmények, valamint a vizsgálatot végző laboratórium történeti kontrolladatai alapján értékelnek. Minden kísérletben helyesen kell besorolni valamennyi kontrollanyagot (a referenciaösztrogént, valamint a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Másodszor pedig fel kell mérni, hogy az összes többi lemezen végzett kontrollok eredményei egybevágóak-e az 1. lemez eredményeivel. A vizsgálati vegyi anyag megfelelő koncentrációtartományát kell vizsgálni ahhoz, hogy egyértelműen meg lehessen határozni a kompetitív kötési görbe telítési csúcsát. A vizsgálati vegyi anyag egyes koncentrációinak ismétlései közötti, illetve a három független vizsgálatmenet közötti eltéréseknek észszerűnek és tudományosan védhetőnek kell lenniük. A vizsgálat következetes végrehajtásának képességét bizonyítani kell azáltal, hogy a laboratóriumok adatbázist hoznak létre és tartanak fent a referenciaösztrogén és a kontrollanyagok adataiból. A laboratóriumon belüli reprodukálhatóság mérésére használhatók a referenciaösztrogén és a kontrollként szolgáló gyengén kötődő anyag több kísérletből származó görbeillesztési paraméterei átlagának standard deviációi (SD) vagy variációs koefficiensei (CV). Az egyes vizsgálatmenetek lemezein vizsgált kontrollanyagok és minden vizsgálati vegyi anyag eredményeinek értelmezése során szakmai megítélés alapján kell dönteni.

Ezenkívül érvényesülniük kell az elfogadhatósági kritériumokra vonatkozó alábbi elveknek is:

— elegendő mennyiségű adattal kell rendelkezni ahhoz, hogy számszerűen értékelni lehessen az ösztrogénreceptor-kötést;

— a vizsgált koncentrációknak a vizsgálati vegyi anyag oldhatósági tartományán belül kell maradniuk.

Az adatok elemzése

21. A telítési és a kompetitív kötési adatok meghatározott adatelemzési eljárásának meg kell felelnie a receptor és a ligandum közötti kölcsönhatások jellemzésére vonatkozó főbb elveknek. A telítési kötési adatokat jellemzően egy nem-lineáris regressziós modellel elemzik, amellyel meghatározható mind a teljes, mind a nem specifikus kötődés. A B_{max} és a K_d értékének meghatározásakor a ligandum csökkenése miatt szükség lehet korrekcióra (pl. Swillens, 1995 (19)). A kompetitív kötési vizsgálatok adatait általában transzformálják (pl. a specifikus kötődés arányát és a vizsgálati vegyi

▼M8

anyag koncentrációit (log M)). Az egyes vizsgálati vegyi anyagok log (IC_{50}) értékének megbecsüléséhez egy megfelelő nem-lineáris görbeillesztő szoftvert kell használni, amely illeszteni tud a négyparaméteres Hill-egyenletre. A kezdeti elemzést követően meg kell határozni a görbeillesztési paramétereket, és vizuálisan ellenőrizni kell, hogy a kötési adatok mennyire illeszkednek a létrehozott kompetitív kötési görbére. Bizonyos esetekben a legjobban illeszkedő görbe meghatározásához további elemzésre lehet szükség (pl. a görbe tetejének és/vagy aljának szűkítésére, a 10 %-os szabály alkalmazására, lásd a 4. függeléket és a 2. referenciát (a III.A.2. részben)).

22. Az elfogadhatósági kritériumok (20. pont) teljesítése jelzi a vizsgálati rendszer megfelelő működését, de nem garantálja egy adott vizsgálat adatainak pontosságát. Az adatok pontosságát az jelzi a legjobban, ha az első vizsgálat helyes eredményei megismételhetők.

Az adatok értelmezésének általános kritériumai

23. Jelenleg nincs általánosan elfogadott módszer az ösztrogénreceptor-kötési adatok értelmezésére. Ugyanakkor a humán ösztrogénreceptor által közvetített aktivitás kvalitatív (pl. kötődő/nem kötődő) és/vagy kvantitatív (pl. log IC_{50}, relatív kötődési affinitás (RBA) stb.) értékelésének empirikus adatokon és megalapozott tudományos véleményen kell nyugodnia.

Vizsgálati jelentés

24. A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálat:

— az alkalmazott vizsgálat.

Kontroll/referencia/vizsgálati vegyi anyag

— eredet, gyártási szám, felhasználási határidő, ha rendelkezésre áll;

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitása, ha ismert;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben, ha ismert;

— adott esetben a pH-érték, az ozmolalitás és a kicsapódás mérése abban a tápfolyadékban, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot hozzáadták.

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-névvel, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet alapján, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. alapján;

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai által jellemezve.

▼**M8**

Oldószer/vivőanyag:

— jellemzés (az anyag természete, forgalmazója és gyártási száma);

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása;

— a vizsgálati vegyi anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Receptorok:

— a receptorok eredete (forgalmazó, katalógusszám, receptor faj, a forgalmazó által megadott aktív receptor koncentráció, a forgalmazó által kiadott tanúsítvány);

— a receptorok jellemzése (többek között a telítési kötési vizsgálat eredményei): K_d, B_{max};

— a receptorok tárolása;

— radioaktívan jelölt ligandum:

— forgalmazó, katalógusszám, tétel, specifikus aktivitás.

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgálati körülmények között fennálló oldhatósági korlátok;

— a kötési vizsgálat pufferének összetétele;

— a receptor koncentrációja;

— a nyomjelző (vagyis a radioaktívan jelölt ligandum) koncentrációja;

— a vizsgálati vegyi anyag koncentrációi;

— a vivőanyag aránya a végső vizsgálatban;

— inkubációs hőmérséklet és idő;

— a kötött és a szabad ligandumok elkülönítésére használt módszer;

— pozitív és negatív kontrollanyagok/referenciaanyagok;

— kritériumok, amelyek eldöntik, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen magyarázhatónak tekintendők-e.

Elfogadhatóság ellenőrzése:

— a párhuzamos pozitív kontrollok/referenciaanyagok tényleges IC_{50} és Hill-meredekségi értéke.

Eredmények:

— nyers adatok és a kötött/szabad ligandumokra vonatkozó adatok;

— adott esetben denaturálást ellenőrző vizsgálat;

— ha létezik, a legkisebb hatásos koncentráció (LEC);

— adott esetben az RBA és/vagy az IC_{50} értéke;

— amennyiben lehetséges, a koncentráció-válasz összefüggés;

— statisztikai elemzések, ha végeztek ilyeneket, hiba- és megbízhatósági számításokkal (pl. SEM, SD, CV vagy 95 % CI), és annak leírása, hogy milyen módon kapták ezeket az értékeket.

▼**M8**

Az eredmények értékelése:

— a 10 %-os szabály alkalmazása.

Következtetések

SZAKIRODALOM

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p.20-6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr*. Relat. Cancer., 16(4): p. 1073-89.

(7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol*. Lab. Med., 135(1): p. 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol*. *In vitro*, 22(1): 225-231.

(13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

▼**M8**

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol.* Letters, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

▼M8

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS RÖVIDÍTÉSEK

10 %-os szabály: annak lehetősége, hogy az elemzésből kizárják azokat az adatpontokat, amelyek esetében a [^{3}H]17β-ösztradiol specifikus kötődési arányát mérő ismétlések átlaga legalább 10 %-kal meghaladja a valamely alacsonyabb koncentrációnál megfigyelt átlagértéket (lásd a 4. függeléket).

Elfogadhatósági kritériumok: a kísérleti kontrollok és referenciaszabványok megfelelőségére vonatkozó minimális előírások. Ahhoz, hogy egy kísérlet érvényesnek minősüljön, meg kell felelni valamennyi elfogadhatósági kritériumnak.

Pontosság (egyezőség): a vizsgálati eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés eltérése. A vizsgálat megfelelőségének mutatója, és relevanciájának egyik szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezőség” szinonimájaként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket (1).

CF: Az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére szolgáló fogalmi kerete.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

CV: variációs koefficiens.

E2: 17β-ösztradiol

ED: az endokrin rendszer károsítása.

hERα: humán ösztrogénreceptor alfa.

ER: ösztrogénreceptor.

Ösztrogénhatású aktivitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy a 17β-ösztradiolhoz hasonlóan ösztrogénreceptorokhoz kötődjön. Ezzel a vizsgálati módszerrel a humán ösztrogénreceptor alfához való kötődés észlelhető.

IC_{50}: egy gátló vizsgálati vegyi anyag maximális tényleges hatásának felét kiváltó koncentráció.

ICCVAM: alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottság.

Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság: annak a mutatója, hogy különböző minősített laboratóriumok milyen mértékben képesek ugyanazon protokoll alkalmazásával és ugyanazon anyagok vizsgálatával hasonló kvalitatív és kvantitatív eredményeket elérni. A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság az elővalidálási és validálási folyamat során kerül meghatározásra, és annak mértékét jelzi, hogy az adott vizsgálat mennyire sikeresen vihető át laboratóriumok között; más néven laboratóriumok közötti megismételhetőség (1).

Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság: annak meghatározása, hogy egy adott laboratóriumon belül dolgozó szakemberek milyen mértékben képesek egy meghatározott protokoll alapján különböző időpontokban sikeresen megismételni az eredményeket. Más néven „laboratóriumon belüli megismételhetőség” (1).

LEC: a legkisebb hatásos koncentráció a vizsgálati vegyi anyag azon legalacsonyabb koncentrációja, amely választ vált ki (vagyis a vizsgálati vegyi anyag legkisebb koncentrációja, amelynél az indukciós tényező statisztikailag eltér a párhuzamos vivőanyagos kontrolltól).

Me-too vizsgálat: olyan vizsgálatok köznapi elnevezése, amelyek strukturálisan és funkcionálisan hasonlóak egy validált és elfogadott, referenciaként szolgáló vizsgálati módszerhez. A hasonló vizsgálati módszer szinonimája.

▼M8

PBTG: teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás.

Teljesítményszabványok: validált vizsgálati módszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálat összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: (1) a vizsgálat alapvető összetevői; (2) a referencia-vegyianyagok minimális jegyzéke, amely a validált vizsgálati módszer elfogadható teljesítményének igazolására használt vegyi anyagokból került összeállításra; és (3) a validált vizsgálati módszer eredményei alapján meghatározott, hasonló megbízhatósági és pontossági szintek, amelyeket a javasolt vizsgálatnak teljesítenie kell a minimális jegyzék referencia-vegyianyagainak felhasználásával történő értékelése során (1).

Jártassági tesztanyagok: a teljesítményszabványokban megadott referenciaanyagokon belüli alcsoport, amelyet a laboratóriumok felhasználhatnak egy adott szabványosított vizsgálatban való szakmai jártasságuk igazolására. Ezeket az anyagokat általában az alapján választják ki, hogy összességükben lefedik a válaszreakciók lehetséges tartományát, kereskedelmi forgalomban kaphatók és rendelkezésre állnak rájuk vonatkozó minőségi referenciaadatok.

Jártasság: annak igazolása, hogy a laboratórium képes megfelelően lefolytatni egy adott vizsgálatot, mielőtt ismeretlen anyagokat tesztelne.

Referenciaösztrogén: 17ß-ösztradiol (E2, CAS-száma: 50-28-2).

Vizsgálati referenciamódszerek: A 493. teljesítményalapú vizsgálati iránymutatás alapját képező vizsgálatok.

RBA: relatív kötési affinitás. Valamely anyag relatív kötési affinitását az anyag log (IC_{50}) értékének a 17β-ösztradiol log (IC_{50}) értékéhez viszonyított arányaként határozzák meg.

Relevancia: valamely vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálat pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (1).

Megbízhatóság: a vizsgálat laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg.

SD: standard deviáció.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Validált vizsgálati módszer: olyan vizsgálat, amelynek az adott céllal kapcsolatos relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága validálási vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a validált vizsgálati módszer a javasolt felhasználási célra nem feltétlenül kínál megfelelő pontosságú és megbízhatóságú elfogadható eljárást (1).

Validálás: az az eljárás, amelynek révén megállapítják egy bizonyos megközelítés, módszer, vizsgálat, eljárás vagy értékelés adott célra való megbízhatóságát és relevanciáját (1).

▼**M8**

2. függelék

A FREYBERGER-WILSON-FÉLE TELJES HOSSZÚSÁGÚ REKOMBINÁNS ÖSZTROGÉNRECEPTOR A (ERA) HASZNÁLATÁN ALAPULÓ IN VITRO TELÍTÉSI ÉS KOMPETITÍV KÖTÉSI VIZSGÁLATOK

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

1. Ez az *in vitro* ösztrogénreceptor (ERα) telítési és kompetitív kötési vizsgálat teljes hosszúságú humán ERα (hrERα) receptort alkalmaz, amelyet bakulovírussal fertőzött rovarsejtekben termeltetnek és izolálnak. A Freyberger és Wilson által kidolgozott protokollt több laboratórium részvételével zajló, nemzetközi validálási tanulmánynak (2) vetették alá, amely bizonyította, hogy a vizsgálat tervezett felhasználása tekintetében releváns és megbízható.

2. A vizsgálat egy szűrési eljárás, amelynek révén azonosíthatók a teljes hosszúságú humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődni képes anyagok. A vizsgálatot annak meghatározására alkalmazzák, hogy egy adott vizsgálati vegyi anyag képes-e vetélkedni a 17β-ösztradiollal a humán ösztrogénreceptor α-hoz való kötődésért. A vizsgálat kvantitatív eredményei magukban foglalhatják az IC_{50} értéket (vagyis azt a koncentrációt, amelyre a vizsgálati vegyi anyagnak szüksége van ahhoz, hogy a [^{3}H]-17β-ösztradiol felét leszorítsa a humán ösztrogénreceptor α-ról), valamint a vizsgálati vegyi anyag humán ösztrogénreceptor α-hoz való relatív – a 17β-ösztradiolhoz viszonyított – kötési affinitását. A vegyi anyagok szűrése céljából a vizsgálat elfogadható kvalitatív eredményei kiterjedhetnek a vizsgálati vegyi anyagok humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődő, nem kötődő, illetve nem egyértelmű kategóriába sorolására, ezek meghatározására a kötési görbékre vonatkozó kritériumok alapján kerül sor.

3. A vizsgálat radioaktív ligandumot használ, ezért a laboratóriumnak rendelkeznie kell radioaktív anyagok használatára vonatkozó engedéllyel. A radioaktív izotópokkal és veszélyes vegyi anyagokkal végzett valamennyi folyamat során be kell tartani a nemzeti jogszabályok által előírt rendelkezéseket és eljárásokat.

4. E vizsgálat szabályozási célra való alkalmazása előtt el kell olvasni az „**ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS**” és „**A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI**” részt. Az ebben a vizsgálati iránymutatásban használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLATI ELVEK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

5. A humán ösztrogénreceptor α-kötési vizsgálat azt méri, hogy milyen mértékben képes egy radioaktívan jelölt ligandum (a [^{3}H]17β-ösztradiol) az ösztrogénreceptorhoz kötődni egy adott vizsgálati vegyi anyag (a kompetítor) növekvő koncentrációjának jelenlétében. Az ösztrogénreceptorok iránt nagy affinitást mutató vizsgálati vegyi anyagok alacsonyabb koncentrációban versenyeznek a radioaktívan jelölt ligandummal azokhoz a vegyi anyagokhoz képest, amelyek kisebb affinitást mutatnak a receptor iránt.

6. A vizsgálat két fő összetevőből áll: egy telítési kötési kísérletből, amelynek során meghatározzák a receptor és a ligandum közötti kölcsönhatás paramétereit, majd egy ezután végzett kompetitív kötési kísérletből, amelynek révén jellemzik a vizsgálati vegyi anyag és a radioaktívan jelölt ligandum ösztrogénreceptor-kötőhelyekért folytatott vetélkedését.

7. A telítési kötési kísérlet célja, hogy a kompetitív kötési kísérlet előkészítéseként meghatározzák a receptorok egy adott tételének kötési affinitását és a receptorok számát. A telítési kötési kísérlet egyensúlyi állapotban méri egy fix koncentrációjú ösztrogénreceptor természetes ligandumához való kötési affinitását (amelynek mutatója a disszociációs állandó, a K_d) és a receptor aktív kötőhelyeinek koncentrációját (B_{max}).

▼M8

8. A kompetitív kötési kísérletben azt mérik, hogy egy adott anyag milyen mértékű affinitással rendelkezik arra, hogy versenyezzen a [^{3}H]17β-ösztradiollal az ösztrogénreceptorral formált kötésért. Az affinitást a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációjával számszerűsítik, amely egyensúlyi állapotban meggátolja a [^{3}H]17β-ösztradiol specifikus kötődésének 50 %-át (ez az úgynevezett „50 %-os gátlást kiváltó koncentráció” vagy IC_{50}). Az affinitás mérhető emellett a relatív kötési affinitással is (RBA, az ösztradiol ugyanazon vizsgálatmenetben, de külön mért IC_{50} értékéhez viszonyított affinitás). A kompetitív kötési kísérlet azt méri, hogy milyen mértékben kötődik egy fix koncentrációban alkalmazott [^{3}H]17β-ösztradiol a vizsgálati vegyi anyag széles skálát (nyolc nagyságrendet) lefedő koncentrációja jelenlétében. Ezt követően – ahol lehetséges – az adatokat a Hill-egyenlet olyan formájára illesztik (Hill, 1910), amely meghatározza, hogy milyen mértékben szorítják le az egy kötőhelyet elfoglaló kompetitív kötődő anyagok a radioaktív ligandumot. A radioaktívan jelölt ösztradiol egyensúlyi állapotban történő leszorításának mértéke alapján jellemzik a vizsgálati vegyi anyagot kötődő, nem kötődő, vagy kétértelmű választ adó anyagként.

ELJÁRÁS

A humán ösztrogénreceptor α fehérje elfogadható teljesítményének igazolása

9. A telítési és a kompetitív kötési vizsgálatok rutinszerű alkalmazása előtt a humán ösztrogénreceptor α minden új tételéről bizonyítani kell, hogy megfelelő teljesítményt nyújt abban a laboratóriumban, ahol használni fogják. A megfelelő teljesítmény egy két lépésből álló eljárással bizonyítható. Ez a két lépés a következő:

— A humán ösztrogénreceptor α-specifikusságának és -telítettségének igazolása érdekében végezzünk el egy telítési [^{3}H]-17β-ösztradiol kötési vizsgálatot. Az adatok nem-lineáris regressziós analízise (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), majd azt követő Scatchard-plot ábrázolása az egyes hrERα-tételekre vonatkozólag dokumentálja a [^{3}H]-17β-ösztradiol humán ösztrogénreceptor α-hoz való kötési affinitását (K_d) és a receptorok számát (B_{max}).

— Végezzünk el egy kompetitív kötési vizsgálatot a kontrollanyagok (a referenciaösztrogén (17β-ösztradiol)), egy gyengén kötődő anyag (pl. noretinodrel vagy noretindron) és egy nem kötődő anyag (oktil-trietoxiszilán, OTES) használatával. Valamennyi laboratóriumnak létre kell hoznia egy adatbázist annak dokumentálására, hogy a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag IC_{50} értékét és más releváns mutatóit következetesen határozta meg a különböző kísérletek és az eltérő hrERα-tételek vizsgálata során. A kontrollanyagok kompetitív kötési görbéjét alkotó paramétereknek a 95 %-os konfidenciaintervallumon belül kell lenniük (lásd az 1. táblázatot), amelynek értékeit a vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok adatai alapján határozták meg (2).

1. táblázat

A Freyberger–Wilson humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatban használt referenciaösztrogén és gyengén kötődő anyag teljesítményére vonatkozó kritériumok

Anyag	Paraméter	Átlag [a]	Standard deviáció (n)	95 %-os konfidenciaintervallumok [b]	
				Alsó határ	Felső határ
17β-ösztradiol	Görbe teteje (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Görbe alja (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hill-meredekség	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	-8,92 ()	0,18 (67)	-8,97	-8,88

▼**M8**

Anyag	Paraméter	Átlag [a]	Standard deviáció (n)	95 %-os konfidenciaintervallumok [b]	
				Alsó határ	Felső határ
Noretinodrel	Görbe teteje (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Görbe alja (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hill-meredekség	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC_{50} (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindron [c]	Görbe teteje (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Görbe alja (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hill-meredekség	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	LogIC_{50} (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

([a]) Az átlag (n) ± standard deviáció (SD) értékét becsült görbeillesztési paraméterek (négyparaméteres Hill-egyenlet) segítségével számolták ki a validálási tanulmány során négy laboratórium által kontroll céljából végzett vizsgálatmenetek során (lásd a 2. referencia N. függelékét).

([b]) A 95 %-os konfidenciaintervallum útmutatóként szolgál az elfogadhatósági kritériumokhoz.

([c]) A validálási tanulmány során a 4. alfeladatban a noretindron vizsgálata opcionális volt (lásd a 2. referenciát és a 4. alfeladatot). Az átlag ± SD (n) értékét tehát becsült görbeillesztési paraméterek (négyparaméteres Hill-egyenlet) segítségével számolták ki két laboratórium által kontroll céljából végzett vizsgálatmenetek során.

Az IC_{50} tartománya függ a receptor preparátum K_d értékétől és a radioaktívan jelölt ligandum egyes laboratóriumokban alkalmazott koncentrációjától. Megengedhető, hogy a vizsgálat lefolytatásának körülményei alapján az IC_{50} tartományát megfelelő mértékben módosítsák.

A laboratórium jártasságának igazolása

10. Lásd a vizsgálati módszer „**A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI**” részének 17. és 18. pontját, valamint 2. táblázatát. Minden (telítési és kompetitív kötési) vizsgálatnak három független (vagyis a receptor, a vegyi anyagok és a reagensek frissen készített oldataival végezett), különböző napokon lefolytatott vizsgálatmenetből kell állnia, az egyes vizsgálatmeneteknek pedig három ismétlést kell tartalmazniuk.

A receptor (hrERα) koncentrációjának meghatározása

11. Az aktív receptor koncentrációja tételenként és tárolási feltételek szerint kissé változó. Ebből adódóan a forgalmazótól való átvételkor meg kell határozni az aktív receptor koncentrációját. Így megállapítható az aktív receptor vizsgálatmenet során alkalmazandó megfelelő koncentrációja.

12. A kompetitív kötési vizsgálatnak megfelelő körülmények között (vagyis 1 nM [^{3}H]-ösztradiollal) a receptort 0,25, 0,5, 0,75 és 1 nM névleges koncentrációban inkubálni kell 1 μM nem jelölt ösztradiol jelenlétében (nem specifikus kötődés) és annak hiányában (teljes kötődés). A specifikus kötődést, amely a teljes és a nem specifikus kötődés különbségeként határozható meg, ábrázolni kell a receptor névleges koncentrációja függvényében. A receptort abban a névleges koncentrációban kell használni a telítési és a kompetitív kötési kísérletek során, amelynél a specifikus kötődési értékei megegyeznek a hozzáadott radioaktívan jelölt ösztradiol kötési értékeinek 20 %-ával. A humán ösztrogénreceptor 0,5 nM-es végső koncentrációja többnyire eleget tesz ennek a feltételnek.

▼M8

13. Amennyiben a 20 %-os feltétel több próbálkozás után sem teljesül, ellenőrizni kell, hogy nincsenek-e potenciális hibák a kísérlet elrendezésében. A 20 %-os feltétel nem teljesülése jelezheti azt is, hogy a rekombináns tételben nagyon csekély az aktív receptorok száma, ilyen esetben fontolóra kell venni másik receptortétel alkalmazását.

Telítési vizsgálat

14. A [^{3}H]17β-ösztradiolt kell kiértékelni nyolc növekvő koncentrációban, három ismétlésben, az alábbi három kitétellel (lásd a 2. táblázatot):

— Nem jelölt 17β-ösztradiol nélkül és ösztrogénreceptorral. Ez alapján határozható meg a teljes kötődés a csak [^{3}H]17β-ösztradiolt tartalmazó lyukakban mért radioaktivitás alapján.

— A jelölt 17β-ösztradiolhoz képest 1000-szeres koncentrációjú nem jelölt 17β-ösztradiol jelenlétében és ösztrogénreceptorral. Ez az állapot arra szolgál, hogy az aktív kötőhelyek telítődjenek nem jelölt 17β-ösztradiollal, így a lyukakban mért radioaktivitás alapján meghatározható a nem specifikus kötődés. A fennmaradó, receptorhoz kötődő radioaktív ösztrogének feltételezhetően nem specifikus helyre kötődőnek, mivel a nem jelölt ösztrogének olyan magas koncentrációban vannak jelen, hogy elfoglalják a receptor valamennyi szabad specifikus kötőhelyét.

— Nem jelölt 17β-ösztradiol és ösztrogénreceptor nélkül (így meghatározható a teljes radioaktivitás).

A [^{3}H]-17β-ösztradiol és a nem jelölt 17β-ösztradiol oldatainak elkészítése

15. A [^{3}H]-17β-ösztradiol oldatainak elkészítéséhez a [^{3}H]-17β-ösztradiol 12 nM koncentrációjú törzsoldatához vizsgálati pufferrel beállítjuk a kezdeti, 0,12 nM-től 12 nM-ig terjedő koncentrációtartományt. Ezen oldatokból 40 µl-t adagolunk a 96 lyukú mikrotiterlemez megfelelő vizsgálati lyukaiba (160 µl végtérfogatban), így megkapjuk a vizsgálat végső, 0,03 és 3,0 nM közötti koncentrációértékeit. A vizsgálati puffer, a [^{3}H]-17β-ösztradiol törzsoldatának és oldatainak elkészítését, valamint a koncentrációértékek meghatározását részletesen ismerteti a Freyberger–Wilson protokoll (2).

16. A 17β-ösztradiol etanolos oldatait vizsgálati puffer hozzáadásával kell hígítani, elkészítve a nyolc növekvő elemből álló, 0,06 µM-től 6 µM-ig terjedő kezdeti koncentrációsorozatot. Ezekből az oldatokból 80 µl-t adagolunk a 96 lyukú mikrotiterlemez megfelelő vizsgálati lyukaiba (160 µl végtérfogatban), így megkapjuk a vizsgálat végső, 0,03 µM és 3,0 µM közötti koncentrációértékeit. A nem specifikus kötődést tesztelő lyukakban a nem jelölt 17β-ösztradiol 1000-szeres feleslegben kell legyen a jelölt [^{3}H]-17β-ösztradiol végső koncentrációjához képest. A nem jelölt 17β-ösztradiol oldatainak elkészítését részletesen ismerteti a Freyberger–Wilson protokoll (2).

17. A receptornak azt a névleges koncentrációját kell alkalmazni, amelyik 20 %-os (± 5 %) specifikus kötődést vált ki (lásd a 12–13. pontot). A humán ösztrogénreceptor α oldatot közvetlenül használat előtt kell elkészíteni.

18. A 96 lyukú mikrotiterlemezeket a 2. táblázatban foglaltak szerint készítik el, az egyes koncentrációértékeket 3 ismétlésben vizsgálva. A [^{3}H]-17β-ösztradiol, a nem jelölt 17β-ösztradiol, a puffer és a receptor lemezenkénti koncentrációértékeit és térfogatát a 2.2. függelék tartalmazza.

▼M8

2. táblázat

Mikrotiterlemez elrendezése a telítési kötési vizsgálathoz

	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			Teljes kötődés (oldószer)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,10 μM E2			Nem specifikus kötődés
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-ösztradiol
ER:: ösztrogénreceptor
E2:: nem jelölt 17β-ösztradiol

19. A vizsgálati mikrotiterlemezeket 16–20 órán keresztül 2–8 °C-os hőmérsékleten inkubálni kell, a lemezeket az inkubáció ideje alatt rázógépre kell helyezni.

A humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiol mérése

20. A humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiolokat elkülönítjük a szabad [^{3}H]-17β-ösztradioloktól, ehhez minden lyukhoz hozzáadunk 80 μl hideg DCC szuszpenziót, ezt követően a mikrotiterlemezeket 10 percen át rázatjuk, majd mintegy 2500 rpm sebességgel 10 percen keresztül centrifugáljuk. Annak érdekében, hogy e folyamat során minimálisra szorítsuk a kötött [^{3}H]-17β-ösztradiolok humán ösztrogénreceptor α-ról történő disszociációját, nagyon fontos, hogy a pufferek és a vizsgálati lyukak hőmérsékletét 2 és 8 °C között tartsuk, és minden lépést gyorsan végezzünk el. A lemezek hatékony és gyors feldolgozásához szükség van egy mikrotiterlemez-rázógépre.

21. 50 μl felülúszóban az ösztrogénreceptor α-hoz kötött [^{3}H]-17β-ösztradiolt átvisszük egy második mikrotiterlemezre, nagy figyelemmel végezve a transzfert, nehogy a DCC-hez hozzáérve átszennyezzük a lyukakat.

22. Ezt követően mindegyik lyukhoz (A1–B12 és D1–E12) 200 μl szcintillációs folyadékot adunk, amely képes a radioaktív sugárzás mozgási energiáját fényenergiává alakítani. A G1–H12 lyukak (a teljes percenkénti bomlás (dpms) mutatói) a [^{3}H]-17β-ösztradiol (40 μl) hígítási sorozatát tartalmazzák, amelyet közvetlenül a mérési lemez lyukaiba töltött szcintillációs folyadékba kell helyezni a 3. táblázat szerinti elosztásban, ezek a lyukak tehát csak 200 μl szcintillációs folyadékot és a [^{3}H]-17β-ösztradiol megfelelő hígítását tartalmazzák. Ezek a mérőszámok azt jelzik, hogy mennyi dpms-ben kifejezett [^{3}H]-17β-ösztradiolt adtunk hozzá a teljes kötődést és a nem specifikus kötődést vizsgáló lyukakhoz.

▼M8

3. táblázat

Mikrotiterlemez elrendezése telítési kötési vizsgálathoz, radioaktivitás mérése

	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			Teljes kötődés (oldószer)
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			Nem specifikus kötődés
E	0,30 nM [^{3} H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^{3} H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^{3} H] E2 + ER+ 1,0 μM E2			3,0 nM [^{3} H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G	0,03 nM [3H] E2 (teljes dpms)			0,06 nM [3H] E2			0,08 nM [3H] E2			0,10 nM [3H] E2			Teljes dpms (*)
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-ösztradiol
ER:: ösztrogénreceptor
E2:: nem jelölt 17β-ösztradiol
dpms:: percenkénti bomlás
(*) A [^{3}H] jelölt ösztradiol radioaktív hígítási sorozatát közvetlenül a G1–H12 lyukakban lévő 200 μl szcintillációs folyadékhoz kell adni.

23. A mérés megkezdése előtt legalább 2 órát kell várni, a radioaktivitás mérési ideje pedig mintánként 40 perc legyen. A lyukankénti dpm értékének meghatározásához mikrotiterlemez-szcintillációs számlálót kell alkalmazni, és korrigálni kell az elnyelődött veszteség értékét. Amennyiben nem áll rendelkezésre mikrotiterlemezhez használható szcintillációs számláló, a minták hagyományos számlálóval is mérhetők. Ez esetben fontolóra lehet venni a számlálásra fordított idő csökkentését.

Kompetitív kötési vizsgálat

24. A kompetitív kötési vizsgálat azt méri, hogy egy állandó koncentrációjú [^{3}H]-17β-ösztradiol milyen mértékben képes kötődni az adott vizsgálati vegyi anyag növekvő koncentrációja mellett. Egy vizsgálatmeneten belül minden koncentrációt három párhuzamos ismétlésben kell vizsgálni. Emellett minden vizsgálati vegyi anyagot három nem egyidejűleg végzett vizsgálatmenetben kell tesztelni. A vizsgálatot egy vagy több 96 lyukú mikrotiterlemezen kell elvégezni.

Kontrollok

25. A vizsgálat végrehajtása során minden egyes kísérletben párhuzamosan vizsgálni kell az oldószert és a kontrollanyagokat (a referenciaösztrogént, valamint a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Minden vizsgálatmenetben ugyanazon a lemezen vizsgálni kell a referenciaösztrogén teljes koncentrációgörbéjét és a kontrollanyagokat (vagyis a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Az összes többi lemeznek tartalmaznia kell i. az E2 és a gyengén kötődő anyag magas (maximális leszorítást eredményező) és közepes (körülbelül IC_{50} hatást kiváltó) koncentrációját, három ismétlésben; ii. az oldószeres kontrollt és a nem specifikus kötődés mérését, legalább három-három ismétlésben. A vizsgálati puffer, a kontrollanyagok, a [^{3}H]-17β-ösztradiol, a humán ösztrogénreceptor α és a vizsgálati vegyi anyagok oldatainak elkészítési eljárását a 2. referencia ismerteti (K függelék, lásd a Freyberger–Wilson vizsgálati protokollt).

▼M8

Oldószeres kontroll:

26. Az oldószeres kontroll igazolja, hogy az oldószer nem lép kölcsönhatásra a vizsgálati rendszerrel, emellett méri a teljes kötődést (TB). Az ajánlott oldószer az etanol. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációja nem oldható etanolban, akkor alternatívaként DMSO is használható. Az etanol, illetve DMSO használata esetén a DMSO koncentrációja a végső vizsgálati lyukakban 1,5 %, de nem haladhatja meg a 2 %-ot.

Puffer kontroll:

27. A puffer kontroll (BC) nem tartalmazhatja sem az oldószert, sem a vizsgálati vegyi anyagot, csak a vizsgálat összes többi összetevőjét. A puffer kontroll eredményeit összevetik az oldószeres kontroll eredményeivel annak ellenőrzésére, hogy az alkalmazott oldószer nincs hatással a vizsgálati rendszerre.

Erősen kötődő anyag (referenciaösztrogén)

28. A 17β-ösztradiol (CAS-száma: 50-28-2) az endogén ligandum, és magas affinitással kötődik az ösztrogénreceptor alfa altípusához. Minden humán ösztrogénreceptor α kompetitív kötési vizsgálathoz nem jelölt 17β-ösztradiollal el kell készíteni egy standard görbét, amely lehetővé teszi a variabilitás értékelését, ha a laboratóriumon belül egy későbbi időpontban ismét elvégzik a vizsgálatot. A nem jelölt 17β-ösztradiolból nyolc hígítást kell készíteni etanolban, és a vizsgálati lyukakba helyezni a következő koncentrációtartományban: 100 nM-tól 10 pM-ig (-7[logM] és -11[logM] között) és a következő elosztásban: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], - 9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). A nem jelölt 17β-ösztradiol legmagasabb koncentrációja (1 μM) egyben a nem specifikus kötődés indikátoraként is szolgál. Ezt a koncentrációt a 4. táblázatban az „NSB” rövidítés különbözteti meg, bár ez is részét képezi a standard görbének.

Gyengén kötődő anyag

29. A vizsgálatba bele kell foglalni egy gyengén kötődő anyagot (a noretinodrel t (CAS-száma: 68-23-5) vagy a noretindront (CAS-száma: 68-22-4)), hogy igazolja az egyes kísérletek érzékenységét, és lehetővé tegye a variabilitás értékelését, ha a vizsgálatot egy későbbi időpontban megismétlik. A gyengén kötődő anyagból nyolc oldatot kell készíteni etanolban, és a vizsgálati lyukakba helyezni a következő koncentrációtartományban: 3 nM-tól 30 μM-ig (-8,5[logM] és -4,5[logM] között) és a következő elosztásban: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM],-7,5[logM], -8,5[logM].

Nem kötődő anyag

30. Negatív (nem kötődő) kontrollanyagként oktil-trietoxi-szilánt (OTES, CAS-száma: 2943-75-1) kell alkalmazni. Ez biztosítja, hogy a vizsgálat végrehajtása során detektálni lehessen, ha a vizsgálati vegyi anyagok nem kötődnek a humán ösztrogénreceptor α-hoz. A nem kötődő anyagból nyolc oldatot kell készíteni etanolban, és a vizsgálati lyukakba helyezni a következő koncentrációtartományban: 0,1 nM–1000 μM (-10[logM] és -3[logM] között), logaritmikus lépésközönként. Alternatív nem kötődő kontrollanyagként di-*n*-butil-ftalát (DBP) használható. Ez utóbbi anyagról kimutatták, hogy maximális oldhatósága -4[logM].

A humán ösztrogénreceptor α koncentrációja

31. A receptort abban a mennyiségben kell alkalmazni, amelyik 1 nM radioaktív ligandum jelenlétében 20 %-os (± 5 %) specifikus kötődést vált ki (lásd a 2. függelék 12–13. pontját). A humán ösztrogénreceptor α oldatot közvetlenül használat előtt kell elkészíteni.

[^{3}H]-17β-ösztradiol

32. A [^{3}H]-17β-ösztradiolt 1,0 nM koncentrációban kell a vizsgálati lyukakba helyezni.

▼M8

Vizsgálati vegyi anyagok

33. Első lépésként oldhatósági vizsgálatot kell végezni az egyes vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági határértékének meghatározására, valamint a vizsgálati protokoll végrehajtása során alkalmazandó megfelelő koncentrációtartomány megállapítására. A vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági határértékét először oldószerben kell meghatározni, majd a vizsgálati körülmények mellett meg kell erősíteni. A vizsgálat során tesztelt végső koncentráció nem haladhatja meg az 1 mM-t. A koncentrációtartomány-behatároló vizsgálatnak magában kell foglalnia egy oldószeres kontrollt és a legmagasabb elfogadható koncentrációtól (pl. 1 mM, illetve az oldhatósági határértéktől függően ennél alacsonyabb koncentrációtól) induló, 8 koncentrációból álló logaritmikus hígítási sorozatot, az esetlegesen tapasztalt zavarosságot vagy kicsapódást fel kell jegyezni (lásd még a 35. pontot). A vizsgálati vegyi anyagot a koncentrációtartomány behatárolására szolgáló előzetes vizsgálatban meghatározott, 8 log koncentrációintervallumot tartalmazó görbe alapján kell tesztelni. A második és a harmadik kísérlet koncentrációértékeit úgy kell megválasztani, hogy jobban illeszkedjenek a koncentráció-válasz görbéhez.

34. A vizsgálati vegyi anyag oldatait megfelelő oldószerben kell elkészíteni (lásd a 2. függelék 26. pontját). Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációja sem etanolban, sem DMSO-ban nem oldható, és a hozzáadott oldószer mennyiségének növelése miatt a végső vizsgálathoz használt csőben az oldószer koncentrációja túllépné az elfogadható határértéket, a legmagasabb koncentráció az eggyel alacsonyabb koncentrációra csökkenthető. Ebben az esetben hozzá lehet adni egy további koncentrációértéket a koncentrációsorozat alacsonyabb értékeket tartalmazó végéhez. A sorozat többi koncentrációértékét változatlanul kell hagyni.

35. A vizsgálati vegyi anyag mikrotiterlemezbe adagolt oldatait figyelemmel kell követni, mivel a vizsgálati vegyi anyag a vizsgálati lyukakba helyezést követően kicsapódhat. A kicsapódást tartalmazó vizsgálati lyukak adatait ki kell zárni a görbeillesztésből, és fel kell jegyezni az adatok kizárásának okát.

36. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag log(IC_{50}) értékére vonatkozólag léteznek más forrásokból származó korábbi adatok, érdemes lehet geometriailag elosztani az oldatokat (pl. hogy 0,5 log egységnyire helyezkedjenek el a log(IC_{50}) várt értéke körül). A végső eredménynek a log(IC_{50}) mindkét oldalán kellő távolságban eloszló koncentrációkat kell mutatnia, beleértve a görbe tetejét és alját, hogy a kötési görbét megfelelően lehessen jellemezni.

Vizsgálati lemez elrendezése

37. A mikrotiterlemezeket fel kell címkézni, és kódokkal kell ellátni a hatszoros inkubálásnak alávetett oldószeres kontrollt, a referenciaösztrogén legmagasabb koncentrációját – amely egyben a nem specifikus kötődés (NSB) mutatója – és a puffer kontrollt, valamint a háromszor inkubált nem kötődő kontrollanyag (oktil-trietoxi-szilán) mind a nyolc koncentrációját, a referenciaösztrogén 7 alacsonyabb koncentrációját, a gyengén kötődő anyag nyolc dózist képviselő koncentrációit és minden egyes vizsgálati vegyi anyag (TC) 8 koncentrációját. Az alábbi 4. táblázat példát szolgáltat egy olyan lemezelrendezésre, amely biztosítja a referenciaösztrogén és a kontrollanyagok teljes koncentrációgörbéjét. A többi mikrotiterlemez a vizsgálati vegyi anyagok mérésére szolgál, emellett tartalmazniuk kell a lemezen belüli ellenőrzésre szolgáló kontrollanyagokat, vagyis 1) az E2 és a gyengén kötődő anyag magas (maximális leszorítást eredményező) és közepes (körülbelül IC_{50} hatást kiváltó) koncentrációját, három ismétlésben; 2) az oldószeres kontrollt és a nem specifikus kötődés mérését, hat-hat ismétlésben (lásd az 5. táblázatot). A 2.3. függelék példát szolgáltat arra, hogy milyen lemezelrendezést lehet alkalmazni a kompetitív vizsgálatban három ismeretlen vizsgálati vegyi

▼M8

anyag teszteléséhez. A 4. és az 5. táblázatban feltüntetett koncentrációértékek a vizsgálatban használt végső koncentrációkat jelzik. Az E2 maximális koncentrációja 1×10^{-7} M legyen, a gyengén kötődő anyag legmagasabb koncentrációja pedig az 1. lemezen használt legmagasabb koncentráció legyen. Az IC_{50} koncentrációját a laboratóriumnak kell meghatároznia, a kontrollanyagok adatait tartalmazó adatbázisa alapján. Ennek az értéknek közelítenie kell a validálási tanulmányok során nyert értékhez (lásd az 1. táblázatot).

4. táblázat

A kompetitív kötési vizsgálathoz használt mikrotiterlemez azon elrendezése, amely biztosítja a referenciaösztrogén és a kontrollanyagok teljes koncentrációgörbéjét (1. lemez).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (csak oldószer)			TB (csak oldószer)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1\times10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1\times10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Üres (*)		
D	NE ($1\times10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1\times10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1\times10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1\times10^{-7,5}$)			NE ($1\times10^{-8,5}$)		
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	Üres (radioaktívhoz) (**)			Üres (radioaktívhoz) (**)			Puffer kontroll			Puffer kontroll		

Ebben a példában a gyengén kötődő anyag a noretinodrel (NE).
(*) ténylegesen üres, nem használt lyuk.
(**) a lyukat nem használják az inkubáció alatt, de használják a teljes hozzáadott radioaktivitás ellenőrzésére.

5. táblázat

A kompetitív kötési vizsgálathoz használt mikrotiterlemez azon elrendezése, amely biztosítja a vizsgálati vegyi anyagok és a lemezen belüli ellenőrzésre szolgáló kontrollanyagok teljes koncentrációgörbéjét

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (csak oldószer)			TB (csak oldószer)			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 ($1\times10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

Ebben a példában a gyengén kötődő anyag a noretinodrel (NE).

▼M8

A kompetitív kötési vizsgálat elvégzése

38. Amint az a 6. táblázatból is látszik, a lyukakba 80 µl kontrollként szolgáló oldószert és puffert, referenciaösztrogént, gyengén kötődő anyagot, nem kötődő anyagot és vizsgálati pufferben előkészített vizsgálati vegyi anyagokat kell adagolni. Ezt követően minden egyes lyukhoz hozzá kell adni 4 nM koncentrációjú [^{3}H]-17β-ösztradiolt 40 µl mennyiségben. Mintegy 10–15 perces, 2–8 °C hőmérsékleten végzett óvatos ráztatás után hozzá kell adni a 40 µl mennyiségű humán ösztrogénreceptor α oldatot. A vizsgálati mikrotiterlemezeket 16–20 órán keresztül 2–8 °C-os hőmérsékleten inkubálni kell, a lemezeket az inkubáció ideje alatt rázógépre kell helyezni.

6. táblázat

A humán ösztrogénreceptor kompetitív kötési vizsgálat mikrotiterlemezeire helyezett vizsgálati összetevők térfogata

Térfogat (µl)	Összetevő
80	Nem jelölt 17β-ösztradiol, noretinodrel , OTES, vizsgálati vegyi anyagok, oldószer vagy puffer
40	4 nM [^{3}H]-17β-ösztradiol oldat
40	hrERα oldat, a meghatározott koncentrációban
160	***Teljes térfogat az egyes vizsgálati lyukakban***

39. Ezt követően a telítési kötési vizsgálat 20–23. pontjában ismertetett módon minden lyukhoz hozzáadnak 80 µl hideg DCC szuszpenziót, hogy elkülönítsék a humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiolt a szabad [^{3}H]-17β-ösztradioltól, majd megmérik a humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiolok mennyiségét.

40. A H1 és H6 közötti lyukakban (amelyeket a 4. táblázat üres (radioaktívhoz) címen jelöl) mérik a 40 µl mennyiségű [^{3}H] jelölt ösztradiol percenkénti bomlását. A 40 µl-nek megfelelő mennyiséget közvetlenül a H1–H6 lyukakban lévő szcintillációs folyadékhoz kell adni.

Elfogadhatósági kritériumok

Telítési kötési vizsgálat

41. A specifikus kötődési görbének a [^{3}H]-17β-ösztradiol fokozódó koncentrációban való alkalmazása miatt egy platóban kell végződnie, ami jelzi a humán ösztrogénreceptor α ligandummal való telítettségét.

42. A [^{3}H]-17β-ösztradiol 1 nM koncentrációjánál megfigyelt specifikus kötődésnek a minden vizsgálatmenetben mért átlagos teljes radioaktivitás 15–25 %-os elfogadhatósági tartományán belül kell maradnia. E tartománytól való esetenkénti kis mértékű elérés még elfogadható, de ha a vizsgálatmenetek eredménye következetesen kívül esik ezen a tartományon, illetve ha egy adott vizsgálatmenet eredménye jelentősen eltér tőle, akkor ki kell igazítani a fehérjekoncentrációt és meg kell ismételni a telítési vizsgálatot.

43. Az adatoknak egy lineáris Scatchard-plotot kell alkotniuk.

44. A nem specifikus kötődés nem lehet túlzott mértékű. A nem specifikus kötődés értéke jellemzően nem érheti el a teljes kötődés 35 %-át. Ugyanakkor a nem specifikus kötődés aránya esetenként meghaladhatja ezt a határértéket, ha a radioaktívan jelölt 17β-ösztradiol legalacsonyabb vizsgált koncentrációjánál nagyon alacsony percenkénti bomlást mérnek.

▼M8

Kompetitív kötési vizsgálat

45. A nem jelölt 17β-ösztradiol növekvő koncentrációban leszorítja a [^{3}H]-17β-ösztradiolt a receptorról, és ez összhangban van az egy kötőhelyes kompetitív kötéssel.

46. A referenciaösztrogén (vagyis a 17β-ösztradiol) IC_{50} és K_d értékének nagyjából egyenlőnek kell lennie a [^{3}H]-17β-ösztradiol moláris koncentrációjával; a disszociációs állandót a telítési kötési vizsgálatban határozzák meg.

47. A teljes specifikus kötődésnek rendre a 20 ± 5 %-os elfogadhatósági tartományon belül kell maradnia, ha a vizsgálatmenetekben az egyes lyukakhoz hozzáadott összes radioaktívan jelölt anyag átlagos mért koncentrációja 1 nM volt. E tartománytól való esetenkénti kis mértékű elérés még elfogadható, de ha a vizsgálatmenetek eredménye következetesen kívül esik ezen a tartományon, illetve ha egy adott vizsgálatmenet eredménye jelentősen eltér ettől, akkor ki kell igazítani a fehérjekoncentrációt.

48. Az oldószer nem módosíthatja a vizsgálat érzékenységét vagy megismételhetőségét. Az oldószeres kontroll (Tb-ként jelölve) eredményeit összevetik a puffer kontroll eredményeivel annak ellenőrzésére, hogy az alkalmazott oldószer nincs hatással a vizsgálati rendszerre. Amennyiben a TB kontroll és a puffer kontroll hasonló eredményre vezet, akkor az oldószer nem befolyásolja a vizsgálatot.

49. A nem kötődő anyag maximális 10^{-3} M (OTES) vagy 10^{-4} M (DBP) koncentrációnál legfeljebb 25 % [^{3}H]-17β-ösztradiolt szoríthat le a humán ösztrogénreceptor α-ról.

50. A Freyberger–Wilson humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat validálási tanulmányából származó adatok alapján a referenciaösztrogénre és két gyengén kötődő anyagra (pl. noretinodrel , noretindron) vonatkozva teljesítménykritériumokat dolgoztak ki (2. referencia N. függeléke). A validálási tanulmányban részt vevő laboratóriumok 95 %-os konfidenciaintervallumot adtak meg az átlag (n) +/- SD értékéhez minden kontroll vizsgálatmenetben. 95 %-os konfidenciaintervallumot számoltak a görbeillesztési paraméterekre (vagyis a görbe tetejére, aljára, a Hill-meredekségre és a logIC_{50}-re), a referenciaösztrogénre és a gyengén kötődő anyagokra, valamint a gyengén kötődő anyagok referenciaösztrogénhez viszonyított $\log_{10}$RBA értékére vonatkozólag, ami teljesítménykritériumként szolgál a pozitív kontrollanyagok számára. Az 1. táblázat ismerteti a görbeillesztési paraméterek várt tartományait, amelyek használhatók teljesítménykritériumként. A gyakorlatban az IC_{50} tartománya a receptor preparátum K_d értékétől és a ligandum koncentrációjától függően kissé változó lehet.

51. A potenciális vizsgálati vegyi anyagok széles skálája, valamint potenciális affinitásuk és az eredmények (pl. teljes görbe, részleges görbe, nem illeszthető görbe) változatossága miatt a vizsgálati vegyi anyagok görbeillesztési paramétereire nézve nem dolgoztak ki teljesítménykritériumokat. Egy adott vizsgálati vegyi anyag egyes vizsgálatmeneteiből származó eredmények értékelése során azonban szakmai megítélés alapján kell dönteni. A vizsgálati vegyi anyag megfelelő koncentrációtartományát kell használni ahhoz, hogy egyértelműen meg lehessen határozni a kompetitív görbe (pl. 90–100 %-os kötődést jelző) platóját. A vizsgálati vegyi anyag különböző koncentrációin történő ismétlések eltérései közötti és a három független vizsgálatmenet közötti variabilitásnak észszerű mértéken belül kell maradnia és tudományosan védhetőnek kell lennie. Egy adott vizsgálati vegyi anyag minden vizsgálatmenetében elvégzett kontrollok eredményeinek meg kell közelíteniük a Freyberger–Wilson vizsgálat teljesítménymutatóit, és összhangban kell lenniük minden releváns laboratórium történeti kontrolladataival.

▼M8

AZ ADATOK ELEMZÉSE

Telítési kötési vizsgálat

52. Mérni kell mind a teljes, mind a nem specifikus kötődést. Ezen értékek alapján számolható ki a [^{3}H]-17β-ösztradiol növekvő koncentrációin létrejött egyensúlyi állapotokban kiváltott specifikus kötődés úgy, hogy a teljes kötődésből kivonják a nem specifikus kötődést. A specifikus kötődés és a [^{3}H]-17β-ösztradiol koncentrációi közötti függvényt ábrázoló grafikon a maximális specifikus kötődésre jellemző platóban végződik, amely azt az állapotot jelzi, amikor a humán ösztrogénreceptor α telítődött [3H]-17β-ösztradiollal. Emellett az adatok elemzése dokumentálja, hogy a [^{3}H]-17β-ösztradiol egyetlen, nagy affinitású kötőhelyhez kapcsolódik. A nem specifikus, a teljes és a specifikus kötődést egy telítési kötési görbén kell ábrázolni. Az adatokat a továbbiakban nem-lineáris regressziós analízissel kell elemezni (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), végül pedig egy Scatchard-plot grafikonon ábrázolni.

53. Az adatelemzés során kizárólag a teljes kötődési adatok alapján meg kell határozni a B_{max} és a K_d értékét, feltételezve, hogy a nem specifikus kötődés lineáris, más módszer alkalmazását indokolni kell. A legjobban illeszkedő görbét pedig robusztus regresszióval kell meghatározni, az ettől való eltérést indokolni kell. A robusztus regresszió alkalmazásának módszerét meg kell adni. Abban az esetben, ha a B_{max} és a K_d értékét a telítési kötési adatok alapján határozzák meg, mindig korrigálni kell a ligandum koncentrációjának csökkenését (például a Swillens, 1995 által leírt módszerrel).

Kompetitív kötési vizsgálat

54. A kompetitív kötési görbe a [^{3}H]-17β-ösztradiol specifikus kötődésének és a kompetítor ($\log_{10}$ egységekben feltüntetett) koncentrációjának összefüggését ábrázolja. A vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely meggátolja a [^{3}H]-17β-ösztradiol maximális specifikus kötődésének 50 %-át, az IC_{50} érték.

55. A pozitív kontrollanyagok (pl. a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag) becsült $\log(IC_{50})$ értékének meghatározásához egy megfelelő nem-lineáris görbeillesztő szoftvert kell használni, amely illeszteni tudja egy négyparaméteres Hill-egyenlet görbéjét (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). A görbék illesztése során a görbe tetejét, alját, meredekségét jelző értékeket és a $\log(IC_{50})$ értékét általában szabadon ábrázolják. A legjobban illeszkedő görbét robusztus regresszióval kell meghatározni, az ettől való eltérést indokolni kell. A ligandum csökkenését nem kell korrigálni. A kezdeti analízist követően minden kötési görbét ellenőrizni kell, hogy megfelelően illeszkedik-e a modellre. A gyengén kötődő anyag relatív kötési affinitását a gyengén kötődő anyag log (IC_{50}) értékének a 17β-ösztradiol log (IC_{50}) értékéhez viszonyított arányaként kell meghatározni. A pozitív kontrollok és a nem kötődő kontroll eredményeit a vizsgálat e 2. függelék 45–50. pontjában ismertetett teljesítménymutatói alapján kell értékelni.

56. Az összes vizsgálati vegyi anyag adatait lépésenként kell elemezni, biztosítva ezáltal az adatok megfelelő elemzését és a kompetitív kötési görbék helyes osztályozását. Javasolt vizsgálati anyagonként minden vizsgálat megkezdésekor egy szabványosított adatelemzést végezni, amely megegyezik a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag kontrolljainál alkalmazott analízissel (lásd a fenti 55. pontot). Az adatelemzés végeztével technikailag ellenőrizni kell a görbeillesztési paramétereket, valamint vizuálisan is ellenőrizni kell, hogy az adatok mennyire illeszkednek az egyes vizsgálatmenetek kompetitív kötési görbéjéhez. Amennyiben a technikai ellenőrzés során megfigyelhető a specifikusan kötődő [^{3}H]-17β-ösztradiol arányának koncentrációfüggő csökkenése, a vegyi anyagok egyes koncentrációit tartalmazó ismétlések közötti csekély eltérés és a három vizsgálatmenet görbeillesztési paramétereinek következetessége jó indikátorai annak, hogy a vizsgálatot és az adatelemzést megfelelően hajtották végre.

▼M8

Az adatok értelmezése

57. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődő anyagnak minősül, ha az adatokra illeszthető kötési görbe, és a válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 50 %-a alatt helyezkedik el (1. ábra).

58. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, valamely vizsgálati vegyi anyag akkor tekinthető humán ösztrogénreceptor α-hoz nem kötődő anyagnak, ha:

— az adataira illeszthető kötési görbe, és az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 75 %-a felett helyezkedik el, vagy

— az adataira nem illeszthető kötési görbe, és az adatok koncentrációcsoportjai közül a legalsó simítatlan átlagos kötési arány 75 % felett helyezkedik el.

59. A vizsgálati vegyi anyag válasza akkor minősül kétértelműnek, ha a fenti feltételek egyike sem teljesül (vagyis az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 76 és 51 % között helyezkedik el).

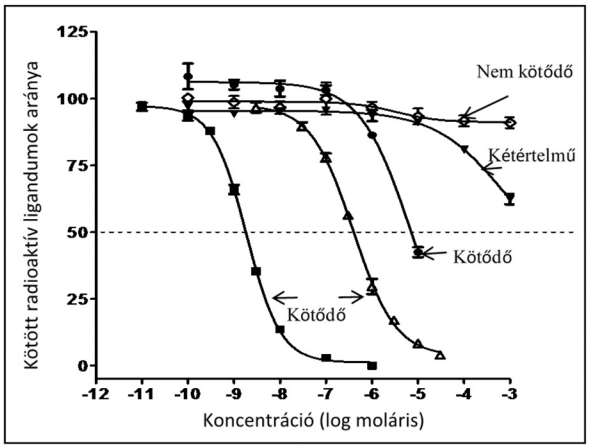
7. táblázat

A vizsgálati vegyi anyagok kompetitív kötési görbén alapuló osztályba sorolásának kritériumai

Besorolás	Kritériumok
Kötődő[a]	Az adatokra illeszthető kötési görbe. A **válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 50 %-a alatt helyezkedik el.**
Nem kötődő[b]	Ha az adatokra illeszthető kötési görbe, az **adattartományra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 75 %-a felett helyezkedik el.**
Kétértelmű[c]	Ha az adatokra nem illeszthető kötési görbe, az **adatok koncentrációcsoportjai közül a legalsó simítatlan átlagos kötési arány 75 % felett helyezkedik el.** Bármely vizsgálatmenet, amelynek eredménye sem a kötődő, sem a nem kötődő kategóriába nem sorolható (pl. az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 76 és 51 % között helyezkedik el).

1. ábra

Példák a vizsgálati vegyi anyagok kompetitív kötési görbén alapuló osztályba sorolására.



▼M8

60. A vizsgálati vegyi anyag egy laboratóriumon belül elvégzett több vizsgálatmenetének eredményét összesítik úgy, hogy egy számértéket társítanak minden vizsgálatmenethez, majd meghatározzák a vizsgálatmenetek átlagát (lásd a 8. táblázatot). A laboratórium vizsgálatmeneteinek összesített eredményét azután összevetik az egyes vizsgálati vegyi anyagok várt besorolásával.

8. táblázat

Az egy laboratóriumon belül több vizsgálatmenetben vizsgálati vegyi anyagok osztályba sorolásának módszere

Számérték társítása az egyes vizsgálatmenetekhez:	
Besorolás	**Számérték**
Kötődő	2
Kétértelmű	1
Nem kötődő	0
Besorolás a vizsgálatmenetek átlagos számértéke alapján:	
Besorolás	**Számérték**
Kötődő	Átlag ≥ 1,5
Kétértelmű	0,5 ≤ Átlag < 1,5
Nem kötődő	Átlag < 0,5

VIZSGÁLATI JELENTÉS

60. Lásd a vizsgálati módszer „A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részének 24. pontját.

▼**M8**

2.1. függelék

SZAKKIFEJEZÉSEK LISTÁJA

[^{3}H]E2: radioaktív tríciummal jelölt 17β-ösztradiol.

DCC: dextránbevonatú aktívszén.

E2: nem jelölt 17β-ösztradiol (semleges).

Vizsgálati puffer: 10 mM trisz, 10 mg/ml szarvasmarha szérum albumin, 2 mM DTT, 10 % glicerin, 0,2 mM leupeptin, pH-értéke 7,5.

hrERα: humán rekombináns ösztrogénreceptor alfa (ligandumkötő domén).

Ismétlés: egyike azon lyukaknak, amelyek azonos mintát tartalmaznak azonos koncentrációban, és vizsgálatuk egy adott vizsgálatmeneten belül, párhuzamosan zajlik. E protokoll keretén belül a vizsgálati vegyi anyagok minden koncentrációját három ismétlésben tesztelik; vagyis a vizsgálati vegyi anyagok minden koncentrációját egyidejűleg három ismétlésben vizsgálják.

Vizsgálatmenet: párhuzamosan vizsgált mikrotiterlemez minden mintája, amely minden szükséges információt biztosít a vizsgálati vegyi anyagok humán ösztrogénreceptor α-hoz való kötődésének jellemzéséhez (nevezetesen a vizsgálati lyukba adagolt összes [^{3}H]-17β-ösztradiol, a [^{3}H]-17β-ösztradiol maximális kötődése a hrERα-hoz, nem specifikus kötődés és a vizsgálati vegyi anyagok különböző koncentrációi által előidézett teljes kötődés). Egy vizsgálatmenet állhat koncentrációnként egyetlen vizsgálati lyukból is (vagyis egy ismétlésből), mivel azonban ez a protokoll három ismétlésben való tesztelést ír elő, egy vizsgálatmenet koncentrációnként három vizsgálati lyukat foglal magában. Emellett a protokoll meghatározza azt is, hogy vegyi anyagonként három független (azaz nem egyidejűleg lefolytatott) vizsgálatmenetre van szükség.

▼**M8**

2.2. függelék

HÁROM ISMÉTLÉSES TIPIKUS [^{3}H]-17B-ÖSZTRADIOL TELÍTÉSI VIZSGÁLAT

Három ismétléses tipikus [^{3}H]-17β-ösztradiol telítési vizsgálat

Pozíció	Ismétlés	Lyuktípus kódja	Radioaktív E2 induló koncentrációja (nM)	Radioaktív E2 térfogata (µl)	Radioaktív E2 végső koncentrációja (nM)	Nem jelölt E2 induló koncentráció (µM)	Nem jelölt E2 térfogata (µl)	Nem jelölt E2 végső koncentrációja (µM)	Puffer térfogata (µl)	Receptor térfogata (µl)	A lyukak teljes térfogata
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

Három ismétléses tipikus [^{3}H]-17β-ösztradiol telítési vizsgálat

Pozíció	Ismétlés	Lyuktípus kódja	Radioaktív E2 induló koncentrációja (nM)	Radioaktív E2 térfogata (µl)	Radioaktív E2 végső koncentrációja (nM)	Nem jelölt E2 induló koncentráció (µM)	Nem jelölt E2 térfogata (µl)	Nem jelölt E2 végső koncentrációja (µM)	Puffer térfogata (µl)	Receptor térfogata (µl)	A lyukak teljes térfogata
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**

Három ismétléses tipikus [^{3}H]-17β-ösztradiol telítési vizsgálat

Pozíció	Ismétlés	Lyuktípus kódja	Radioaktív E2 induló koncentrációja (nM)	Radioaktív E2 térfogata (µl)	Radioaktív E2 végső koncentrációja (nM)	Nem jelölt E2 induló koncentráció (µM)	Nem jelölt E2 térfogata (µl)	Nem jelölt E2 végső koncentrációja (µM)	Puffer térfogata (µl)	Receptor térfogata (µl)	A lyukak teljes térfogata
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	Radioaktív	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Radioaktív	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Radioaktív	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Radioaktív	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Radioaktív	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Radioaktív	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Radioaktív	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Radioaktív	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Radioaktív	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Radioaktív	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Radioaktív	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Radioaktív	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40

▼**M8**

Három ismétléses tipikus [^{3}H]-17β-ösztradiol telítési vizsgálat

Pozíció	Ismétlés	Lyuktípus kódja	Radioaktív E2 induló koncentrációja (nM)	Radioaktív E2 térfogata (µl)	Radioaktív E2 végső koncentrációja (nM)	Nem jelölt E2 induló koncentráció (µM)	Nem jelölt E2 térfogata (µl)	Nem jelölt E2 végső koncentrációja (µM)	Puffer térfogata (µl)	Receptor térfogata (µl)	A lyukak teljes térfogata
H1	1	Radioaktív	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Radioaktív	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Radioaktív	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Radioaktív	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Radioaktív	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Radioaktív	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Radioaktív	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Radioaktív	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Radioaktív	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Radioaktív	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Radioaktív	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Radioaktív	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

A „radioaktív” kifejezéssel jelölt lyukak az inkubálás alatt üresek. A 40 µl-t kizárólag a szcintillációs számlálás céljából adják hozzá a lyukakhoz.

▼**M8**

2.3. függelék:

MINTÁK ELRENDEZÉSE A KOMPETITÍV KÖTÉSI VIZSGÁLATHOZ

Lemez	**Pozíció**	**Ismétlés**	**Lyuk típusa**	**Lyuk kódja**	**Koncentráció kódja**	**Kompetítor induló koncentrációja (M)**	**hrER törzs (µl)**	**Puffer térfogata (µl)**	**Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)**	**Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)**	**Végső térfogat (µl)**	**Kompetítor végső koncentrációja (M)**
Sz	A1	1	teljes kötődés	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
Sz	A2	2	teljes kötődés	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
Sz	A3	3	teljes kötődés	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
Sz	A4	1	teljes kötődés	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
Sz	A5	2	teljes kötődés	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
Sz	A6	3	teljes kötődés	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
Sz	A7	1	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	A8	2	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	A9	3	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	A10	1	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	A11	2	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	A12	3	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	B1	1	nem jelölt E2	Sz	S1	2,00 E^{-07}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-07}
Sz	B2	2	nem jelölt E2	Sz	S1	2,00 E^{-07}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-07}
Sz	B3	3	nem jelölt E2	Sz	S1	2,00 E^{-07}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-07}
Sz	B4	1	nem jelölt E2	Sz	S2	2,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-08}

▼**M8**

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetitor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetitor végső koncentrációja (M)
Sz	B5	2	nem jelölt E2	Sz	S2	2,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-08}
Sz	B6	3	nem jelölt E2	Sz	S2	2,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-08}
Sz	B7	1	nem jelölt E2	Sz	S3	6,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-09}
Sz	B8	2	nem jelölt E2	Sz	S3	6,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-09}
Sz	B9	3	nem jelölt E2	Sz	S3	6,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-09}
Sz	B10	1	nem jelölt E2	Sz	S4	2,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-09}
Sz	B11	2	nem jelölt E2	Sz	S4	2,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-09}
Sz	B12	3	nem jelölt E2	Sz	S4	2,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-09}
Sz	C1	1	nem jelölt E2	Sz	S5	6,00 E^{-10}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-10}
Sz	C2	2	nem jelölt E2	Sz	S5	6,00 E^{-10}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-10}
Sz	C3	3	nem jelölt E2	Sz	S5	6,00 E^{-10}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-10}
Sz	C4	1	nem jelölt E2	Sz	S6	2,00 E^{-10}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-10}
Sz	C5	2	nem jelölt E2	Sz	S6	2,00 E^{-10}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-10}
Sz	C6	3	nem jelölt E2	Sz	S6	2,00 E^{-10}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-10}
Sz	C7	1	nem jelölt E2	Sz	S7	2,00 E^{-11}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-11}
Sz	C8	2	nem jelölt E2	Sz	S7	2,00 E^{-11}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-11}

▼**M8**

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetitor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetitor végső koncentrációja (M)
Sz	C9	3	nem jelölt E2	Sz	S7	2,00 E^{-11}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-11}
Sz	C10	1	üres	üres	B1	—	—	160	—	—	160	—
Sz	C11	2	üres	üres	B2	—	—	160	—	—	160	—
Sz	C12	3	üres	üres	B3	—	—	160	—	—	160	—
Sz	D1	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-05}
Sz	D2	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-05}
Sz	D3	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-05}
Sz	D4	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-05}
Sz	D5	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-05}
Sz	D6	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-05}
Sz	D7	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-06}
Sz	D8	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-06}
Sz	D9	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-06}
Sz	D10	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	D11	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	D12	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	E1	1	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-07}	40		40	80	160	3,0 E^{-07}
Sz	E2	2	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-07}	40		40	80	160	3,0 E^{-07}
Sz	E3	3	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-07}	40		40	80	160	3,0 E^{-07}
Sz	E4	1	noretinodrel	NE	WP	2,00 E^{-07}	40		40	80	160	1,0 E^{-07}
Sz	E5	2	noretinodrel	NE	WP	2,00 E^{-07}	40		40	80	160	1,0 E^{-07}
Sz	E6	3	noretinodrel	NE	WP	2,00 E^{-07}	40		40	80	160	1,0 E^{-07}
Sz	E7	1	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-08}

▼**M8**

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetitor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetitor végső koncentrációja (M)
Sz	E8	2	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-08}
Sz	E9	3	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-08}
Sz	E10	1	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-09}
Sz	E11	2	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-09}
Sz	E12	3	noretinodrel	NE	WP	6,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-09}
Sz	F1	1	OTES	N	OTES	2,00 E^{-03}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-03}
Sz	F2	2	OTES	N	OTES	2,00 E^{-03}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-03}
Sz	F3	3	OTES	N	OTES	2,00 E^{-03}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-03}
Sz	F4	1	OTES	N	OTES	2,00 E^{-04}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-04}
Sz	F5	2	OTES	N	OTES	2,00 E^{-04}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-04}
Sz	F6	3	OTES	N	OTES	2,00 E^{-04}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-04}
Sz	F7	1	OTES	N	OTES	2,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-05}
Sz	F8	2	OTES	N	OTES	2,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-05}
Sz	F9	3	OTES	N	OTES	2,00 E^{-05}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-05}
Sz	F10	1	OTES	N	OTES	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	F11	2	OTES	N	OTES	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	F12	3	OTES	N	OTES	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
Sz	G1	1	OTES	N	OTES	2,00 E^{-07}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-07}
Sz	G2	2	OTES	N	OTES	2,00 E^{-07}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-07}
Sz	G3	3	OTES	N	OTES	2,00 E^{-07}	40	—	40	80	160	3,0 E^{-07}
Sz	G4	1	OTES	N	OTES	2,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-08}
Sz	G5	2	OTES	N	OTES	2,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-08}

▼**M8**

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	G6	3	OTES	N	OTES	2,00 E^{-08}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-08}
Sz	G7	1	OTES	N	OTES	2,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-09}
Sz	G8	2	OTES	N	OTES	2,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-09}
Sz	G9	3	OTES	N	OTES	2,00 E^{-09}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-09}
Sz	G10	1	OTES	N	OTES	2,00 E^{-10}	40	—	40	—	160	1,0 E^{-10}
Sz	G11	2	OTES	N	OTES	2,00 E^{-10}	40	—	40	—	160	1,0 E^{-10}
Sz	G12	3	OTES	N	OTES	2,00 E^{-10}	40	—	40	—	160	1,0 E^{-10}
Sz	H1	1	radioaktív	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Sz	H2	1	radioaktív	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Sz	H3	1	radioaktív	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Sz	H4	1	radioaktív	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Sz	H5	1	radioaktív	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Sz	H6	1	radioaktív	H	H	—	—	—	40	—	40	—
Sz	H7	1	puffer kontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
Sz	H8	1	puffer kontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
Sz	H9	1	puffer kontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
Sz	H10	1	puffer kontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
Sz	H11	1	puffer kontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
Sz	H12	1	puffer kontroll	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

A „radioaktív” kifejezéssel jelölt lyukak az inkubálás alatt üresek. A 40 µl-t kizárólag a szcintillációs számlálás céljából adják hozzá a lyukakhoz.

▼**M8**

Minták elrendezése a kompetitív kötési vizsgálathoz

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetitor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µL)	Puffer térfogata (µL)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetitor végső koncentrációja (M)
P1	A1	1	teljes kötődés	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	teljes kötődés	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	teljes kötődés	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	teljes kötődés	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	teljes kötődés	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	teljes kötődés	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	A8	2	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	A9	3	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	A10	1	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	A11	2	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	A12	3	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S0	2,00 E^{-06}	40	—	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	B1	1	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	1	2,00 E^{-03}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-03}
P1	B2	2	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	1	2,00 E^{-03}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-03}
P1	B3	3	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	1	2,00 E^{-03}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-03}
P1	B4	1	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	2	2,00 E^{-04}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-04}
P1	B5	2	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	2	2,00 E^{-04}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-04}
P1	B6	3	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	2	2,00 E^{-04}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-04}
P1	B7	1	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	3	2,00 E^{-05}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-05}
P1	B8	2	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	3	2,00 E^{-05}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-05}
P1	B9	3	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	3	2,00 E^{-05}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-05}
P1	B10	1	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	4	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	B11	2	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	4	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	B12	3	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	4	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-06}

▼M8

Minták elrendezése a kompetitív kötési vizsgálathoz

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetitor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µL)	Puffer térfogata (µL)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetitor végső koncentrációja (M)
P1	C1	1	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	5	$2{,}00\ E^{-07}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-07}$
P1	C2	2	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	5	$2{,}00\ E^{-07}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-07}$
P1	C3	3	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	5	$2{,}00\ E^{-07}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-07}$
P1	C4	1	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	6	$2{,}00\ E^{-08}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-08}$
P1	C5	2	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	6	$2{,}00\ E^{-08}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-08}$
P1	C6	3	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	6	$2{,}00\ E^{-08}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-08}$
P1	C7	1	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	7	$2{,}00\ E^{-09}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-09}$
P1	C8	2	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	7	$2{,}00\ E^{-09}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-09}$
P1	C9	3	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	7	$2{,}00\ E^{-09}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-09}$
P1	C10	1	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	8	$2{,}00\ E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-10}$
P1	C11	2	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	8	$2{,}00\ E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-10}$
P1	C12	3	1. vizsgálati vegyi anyag	TC1	8	$2{,}00\ E^{-10}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-10}$
P1	D1	1	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	1	$2{,}00\ E^{-03}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-03}$
P1	D2	2	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	1	$2{,}00\ E^{-03}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-03}$
P1	D3	3	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	1	$2{,}00\ E^{-03}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-03}$
P1	D4	1	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	2	$2{,}00\ E^{-04}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-04}$
P1	D5	2	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	2	$2{,}00\ E^{-04}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-04}$
P1	D6	3	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	2	$2{,}00\ E^{-04}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-04}$
P1	D7	1	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	3	$2{,}00\ E^{-05}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-05}$
P1	D8	2	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	3	$2{,}00\ E^{-05}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-05}$
P1	D9	3	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	3	$2{,}00\ E^{-05}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-05}$
P1	D10	1	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	4	$2{,}00\ E^{-06}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-06}$
P1	D11	2	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	4	$2{,}00\ E^{-06}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-06}$
P1	D12	3	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	4	$2{,}00\ E^{-06}$	40	0	40	80	160	$1{,}0\ E^{-06}$

▼M8

Minták elrendezése a kompetitív kötési vizsgálathoz

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetitor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µL)	Puffer térfogata (µL)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetitor végső koncentrációja (M)
P1	E1	1	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	5	2,00 E^{-07}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-07}
P1	E2	2	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	5	2,00 E^{-07}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-07}
P1	E3	3	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	5	2,00 E^{-07}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-07}
P1	E4	1	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0 E^{-08}
P1	E5	2	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0 E^{-08}
P1	E6	3	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0 E^{-08}
P1	E7	1	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	7	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-09}
P1	E8	2	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	7	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-09}
P1	E9	3	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	7	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-09}
P1	E10	1	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	8	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-10}
P1	E11	2	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	8	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-10}
P1	E12	3	2. vizsgálati vegyi anyag	TC2	8	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-10}
P1	F1	1	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	1	2,00 E^{-03}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-03}
P1	F2	2	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	1	2,00 E^{-03}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-03}
P1	F3	3	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	1	2,00 E^{-03}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-03}
P1	F4	1	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	2	2,00 E^{-04}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-04}
P1	F5	2	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	2	2,00 E^{-04}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-04}
P1	F6	3	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	2	2,00 E^{-04}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-04}
P1	F7	1	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	3	2,00 E^{-05}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-05}
P1	F8	2	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	3	2,00 E^{-05}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-05}
P1	F9	3	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	3	2,00 E^{-05}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-05}
P1	F10	1	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	4	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	F11	2	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	4	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-06}
P1	F12	3	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	4	2,00 E^{-06}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-06}

▼M8

Minták elrendezése a kompetitív kötési vizsgálathoz

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetitor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µL)	Puffer térfogata (µL)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetitor végső koncentrációja (M)
P1	G1	1	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	5	2,00 E^{-07}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-07}
P1	G2	2	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	5	2,00 E^{-07}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-07}
P1	G3	3	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	5	2,00 E^{-07}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-07}
P1	G4	1	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	6	2,00 E^{-08}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-08}
P1	G5	2	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	6	2,00 E^{-08}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-08}
P1	G6	3	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	6	2,00 E^{-08}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-08}
P1	G7	1	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	7	2,00 E^{-09}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-09}
P1	G8	2	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	7	2,00 E^{-09}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-09}
P1	G9	3	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	7	2,00 E^{-09}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-09}
P1	G10	1	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	8	2,00 E^{-10}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-10}
P1	G11	2	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	8	2,00 E^{-10}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-10}
P1	G12	3	3. vizsgálati vegyi anyag	TC3	8	2,00 E^{-10}	40	0	40	80	160	1,0 E^{-10}
P1	H1	1	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretinodrel	NE		1,00 $E^{-4,5}$	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretinodrel	NE		1,00 $E^{-4,5}$	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretinodrel	NE		1,00 $E^{-4,5}$	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	nem jelölt E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	nem jelölt E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	nem jelölt E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	nem jelölt E2 S			1,00 E^{-7}	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	nem jelölt E2 S			1,00 E^{-7}	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	nem jelölt E2 S			1,00 E^{-7}	40	0	40	80	160	

▼**M8**

3. függelék

A CERI INTÉZET (CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE) HUMÁN REKOMBINÁNS LIGANDUMKÖTŐ DOMÉNNEL RENDELKEZŐ ERA FEHÉRJE HASZNÁLATÁN ALAPULÓ *IN VITRO* ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLATA

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

1. Ez az *in vitro* ösztrogénreceptor (ERα) telítési és kompetitív kötési vizsgálat a humán ösztrogénrecptor α (hrERα) ligandumkötő doménjét alkalmazza. A japán CERI Intézet által előállított fehérjekonstrukció egy glutation-S-transzferáz (GST) fúziós fehérje, amelyet *E. coli*-ban termeltetnek. A CERI protokollt több laboratórium részvételével zajló, nemzetközi validálási tanulmánynak (2) vetették alá, amely bizonyította, hogy a vizsgálat tervezett felhasználása tekintetében releváns és megbízható.

2. A vizsgálat egy szűrési eljárás, amelynek révén azonosíthatók a humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődni képes anyagok. A vizsgálatot annak meghatározására alkalmazzák, hogy egy adott vizsgálati vegyi anyag képes-e versenyezni a 17β-ösztradiollal a humán ösztrogénreceptor α ligandumkötő doménjéhez való kötődésért. A vizsgálat kvantitatív eredményei magukban foglalhatják az IC_{50} értéket (vagyis azt a koncentrációt, amelyre a vizsgálati vegyi anyagnak szüksége van ahhoz, hogy a [^{3}H]-17β-ösztradiol felét leszorítsa a humán ösztrogénreceptor α-ról), valamint a vizsgálati vegyi anyag humán ösztrogénreceptor α-hoz való relatív – a 17β-ösztradiolhoz viszonyított – kötési affinitását. A vegyi anyagok szűrése céljából a vizsgálat elfogadható kvalitatív eredményei kiterjedhetnek a vizsgálati vegyi anyagok humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődő, nem kötődő, illetve nem egyértelmű kategóriába sorolására, ezek meghatározására a kötési görbékre vonatkozó kritériumok alapján kerül sor.

3. A vizsgálat radioaktív ligandumot használ, ezért a laboratóriumnak rendelkeznie kell radioaktív anyagok használatára vonatkozó engedéllyel. A radioaktív izotópokkal és veszélyes vegyi anyagokkal végzett valamennyi folyamat során be kell tartani a nemzeti jogszabályok által előírt rendelkezéseket és eljárásokat.

4. E vizsgálat szabályozási célra való alkalmazása előtt el kell olvasni az „**ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS**” és „**A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI**” részt. Az ebben a vizsgálati iránymutatásban használt fogalmak és rövidítések meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLATI ELVEK (LÁSD MÉG AZ ÁLTALÁNOS BEVEZETÉST)

5. A humán ösztrogénreceptor α-kötési vizsgálat azt méri, hogy milyen mértékben képes egy radioaktívan jelölt ligandum (a [^{3}H]17β-ösztradiol) az ösztrogénreceptorhoz kötődni egy adott vizsgálati vegyi anyag (a kompetítor) növekvő koncentrációjának jelenlétében. Az ösztrogénreceptorok iránt nagy affinitást mutató vizsgálati vegyi anyagok alacsonyabb koncentrációban versenyeznek a radioaktívan jelölt ligandummal azokhoz a vegyi anyagokhoz képest, amelyek kisebb affinitást mutatnak a receptor iránt.

6. A vizsgálat két fő összetevőből áll: egy telítési kötési kísérletből, amelynek során meghatározzák a receptor és a ligandum közötti kölcsönhatás paramétereit, majd egy ezután végzett kompetitív kötési kísérletből, amelynek révén jellemzik a vizsgálati vegyi anyag és a radioaktívan jelölt ligandum ösztrogénreceptor-kötőhelyekért folytatott vetélkedését.

▼M8

7. A telítési kötési kísérlet célja, hogy a kompetitív kötési kísérlet előkészítéseként meghatározzák a receptorok egy adott tételének kötési affinitását és a receptorok számát. A telítési kötési kísérlet egyensúlyi állapotban méri egy fix koncentrációjú ösztrogénreceptor természetes ligandumához való kötési affinitását (amelynek mutatója a disszociációs állandó, a K_d) és a receptor aktív kötőhelyeinek koncentrációját (B_{max}).

8. A kompetitív kötési kísérletben azt mérik, hogy egy adott anyag milyen mértékű affinitással rendelkezik arra, hogy versenyezzen a [^{3}H]17β-ösztradiollal az ösztrogénreceptorral formált kötésért. Az affinitást a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációjával számszerűsítik, amely egyensúlyi állapotban meggátolja a [^{3}H]17β-ösztradiol specifikus kötődésének 50 %-át (ez az úgynevezett „50 %-os gátlást kiváltó koncentráció” vagy IC_{50}). Az affinitás mérhető emellett a relatív kötési affinitással is (RBA, az ösztradiol ugyanazon vizsgálatmenetben, de külön mért IC_{50} értékéhez viszonyított affinitás). A kompetitív kötési kísérlet azt méri, hogy milyen mértékben kötődik egy fix koncentrációban alkalmazott [^{3}H]17β-ösztradiol a vizsgálati vegyi anyag széles skálát (nyolc nagyságrendet) lefedő koncentrációja jelenlétében. Ezt követően – ahol lehetséges – az adatokat a Hill-egyenlet olyan formájára illesztik (Hill, 1910), amely meghatározza, hogy milyen mértékben szorítják le az egy kötőhelyet elfoglaló kompetitív kötődő anyagok a radioaktív ligandumot. A radioaktívan jelölt ösztradiol egyensúlyi állapotban történő leszorításának mértéke alapján jellemzik a vizsgálati vegyi anyagot kötődő, nem kötődő, vagy kétértelmű választ adó anyagként.

ELJÁRÁS

A humán ösztrogénreceptor α fehérje elfogadható teljesítményének igazolása

9. A telítési és a kompetitív kötési vizsgálatok rutinszerű alkalmazása előtt a humán ösztrogénreceptor α minden új tételéről bizonyítani kell, hogy megfelelő teljesítményt nyújt abban a laboratóriumban, ahol használni fogják. A megfelelő teljesítmény egy két lépésből álló eljárással bizonyítható. Ez a két lépés a következő:

— A humán ösztrogénreceptor α-specifikusságának és -telítettségének igazolása érdekében végezzünk el egy telítési[^{3}H]-17β-ösztradiol kötési vizsgálatot. Az adatok nem-lineáris regressziós analízise (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), majd azt követő Scatchard-plot ábrázolása egy adott hrERα-tételre vonatkozólag dokumentálja a [^{3}H]-17β-ösztradiol humán ösztrogénreceptor α-hoz való kötési affinitását (K_d) és a receptorok számát (B_{max}).

— Végezzünk el egy kompetitív kötési vizsgálatot a kontrollanyagok (a referenciaösztrogén (17β-ösztradiol), egy gyengén kötődő anyag (pl. noretinodrel vagy noretindron) és egy nem kötődő anyag (oktil-trietoxiszilán, OTES)) használatával. Valamennyi laboratóriumnak létre kell hoznia egy adatbázist annak dokumentálására, hogy a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag IC_{50} értékét és releváns mutatóit következetesen határozta meg a különböző kísérletek és az eltérő humán ösztrogénreceptor α-tételek vizsgálata során. Emellett a kontrollanyagok kompetitív kötési görbéjét alkotó paramétereknek a 95 %-os konfidenciaintervallumon belül kell lenniük (lásd az 1. táblázatot), amelynek értékeit a vizsgálat validálási tanulmányában részt vevő laboratóriumok adatai alapján határozták meg (2).

1. táblázat

A CERI humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatban használt referenciaösztrogén és gyengén kötődő anyag teljesítményére vonatkozó kritériumok

Anyag	Paraméter	Átlag [a]	Standard deviáció (n)	95 %-os konfidenciaintervallumok [b]	
				Alsó határ	Felső határ
17β-ösztradiol	Görbe teteje	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Görbe alja	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43

▼M8

Anyag	Paraméter	Átlag ([a])	Standard deviáció (n)	95 %-os konfidenciaintervallumok ([b])	
				Alsó határ	Felső határ
	Hill-meredekség	–1,22	0,20 (70)	–1,27	–1,17
	$LogIC_{50}$	–8,93	0,23 (70)	–8,98	–8,87
Noretinodrel	Görbe teteje	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Görbe alja	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hill–meredekség	–1,04	0,21 (68)	–1,09	–0,99
	$LogIC_{50}$	–6,19	0,40 (68)	–6,29	–6,10
Noretindron ([c])	Görbe teteje	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Görbe alja	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hill–meredekség	–1,18	0,32 (23)	–1,31	–1,04
	$LogIC_{50}$	–6,01	0,54 (23)	–6,25	–5,78

([a]) Az átlag ± standard deviáció (SD) értékét ((n) mintaérettel) becsült görbeillesztési paraméterek (négyparaméteres Hill-egyenlet) segítségével számolták ki a validálási tanulmány során négy laboratórium által kontroll céljából végzett vizsgálatmenetek során (lásd a 2. referencia N. függelékét).

([b]) A 95 %-os konfidencia útmutatóként szolgál az elfogadhatósági kritériumokhoz.

([c]) A validálási tanulmány során a 4. alfeladatban a noretindron vizsgálata opcionális volt (lásd a 2. referenciát és a 4. alfeladatot). Az átlag ± SD (n) értékét tehát becsült görbeillesztési paraméterek (négyparaméteres Hill-egyenlet) segítségével számolták ki két laboratórium által kontroll céljából végzett vizsgálatmenetek során.
Az IC_{50} tartománya függ a receptor preparátum K_d értékétől és a radioaktívan jelölt ligandum egyes laboratóriumokban alkalmazott koncentrációjától. Megengedhető, hogy a vizsgálat lefolytatásának körülményei alapján az IC_{50} tartományát megfelelő mértékben módosítsák.

A laboratórium jártasságának igazolása

10. Lásd a vizsgálati módszer „**A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR–KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI**” részének 17. és 18. pontját, valamint 2. táblázatát. Minden (telítési és kompetitív kötési) vizsgálatnak három független (vagyis a receptor, a vegyi anyagok és a reagensek frissen készített oldataival végezett), különböző napokon lefolytatott vizsgálatmenetből kell állnia, az egyes vizsgálatmeneteknek pedig három ismétlést kell tartalmazniuk.

A receptor (hrERα) koncentrációjának meghatározása

11. Az aktív receptor koncentrációja tételenként és tárolási feltételek szerint kissé változó. Ebből adódóan a forgalmazótól való átvételkor meg kell határozni az aktív receptor koncentrációját. Így megállapítható az aktív receptor vizsgálatmenet során alkalmazandó megfelelő koncentrációja.

12. A kompetitív kötési vizsgálatnak megfelelő körülmények között (vagyis 0,5 nM [^{3}H]–ösztradiollal) a receptort 0,1, 0,2, 0,4 és 0,6 nM névleges koncentrációban inkubálni kell 1 μM nem jelölt ösztradiol jelenlétében (nem specifikus kötődés) és annak hiányában (teljes kötődés). A specifikus kötődést,

▼M8

amely a teljes és a nem specifikus kötődés különbségeként határozható meg, ábrázolni kell a receptor névleges koncentrációja függvényében. A receptort abban a névleges koncentrációban kell használni a telítési és a kompetitív kötési kísérletek során, amelynél a specifikus kötődési értékei megegyeznek a hozzáadott radioaktívan jelölt ösztradiol kötési értékeinek 40 %-ával. A humán ösztrogénreceptor 0,2 nM-es végső koncentrációja többnyire eleget tesz ennek a feltételnek.

13. Amennyiben a 40 %-os feltétel több próbálkozás után sem teljesül, ellenőrizni kell, hogy nincsenek-e potenciális hibák a kísérlet elrendezésében. A 40 %-os feltétel nem teljesülése jelezheti azt is, hogy a rekombináns tételben nagyon csekély az aktív receptorok száma, ilyen esetben fontolóra kell venni másik receptortétel alkalmazását.

Telítési vizsgálat

14. A [^{3}H]17β-ösztradiolt kell kiértékelni nyolc növekvő koncentrációban, három ismétlésben, az alábbi három kitétellel (lásd a 2. táblázatot):

a. Nem jelölt 17β-ösztradiol nélkül és ösztrogénreceptorral. Ez alapján határozható meg a teljes kötődés a csak [^{3}H]17β-ösztradiolt tartalmazó lyukakban mért radioaktivitás alapján.

b. A jelölt 17β-ösztradiolhoz képest 2000-szeres koncentrációjú nem jelölt 17β-ösztradiol jelenlétében és ösztrogénreceptorral. Ez az állapot arra szolgál, hogy az aktív kötőhelyek telítődjenek nem jelölt 17β-ösztradiollal, így a lyukakban mért radioaktivitás alapján meghatározható a nem specifikus kötődés. A fennmaradó, receptorhoz kötődő radioaktív ösztrogének feltételezhetően nem specifikus helyre kötődőnek, mivel a nem jelölt ösztrogének olyan magas koncentrációban vannak jelen, hogy elfoglalják a receptor valamennyi szabad specifikus kötőhelyét.

c. Nem jelölt 17β-ösztradiol és ösztrogénreceptor nélkül (így meghatározható a teljes radioaktivitás).

A [^{3}H]-17β-ösztradiol és a nem jelölt 17β-ösztradiol oldatainak és a humán ösztrogénreceptor α-nak az elkészítése

15. A [^{3}H]-17β-ösztradiolból 40 nM koncentrációjú oldatot kell készíteni 1 μM [^{3}H]-17β-ösztradiol törzsoldatból DMSO-ban, úgy, hogy DMSO-t adunk hozzá (200 nM oldatot készítünk), majd szobahőmérsékleten a vizsgálati puffer hozzáadásával elkészítjük a 40 nM koncentrációjú oldatot. Ezzel a 40 nM koncentrációjú oldattal és a vizsgálati pufferrel szobahőmérsékleten el kell elkészíteni a [^{3}H]-17β-ösztradiol 0,313 nM-től 40 nM-ig terjedő oldatsorozatát (a 2. táblázat 12. sávja alapján). A 0,0313 és 4,0 nM közötti végső vizsgálati koncentrációtartományt úgy kapjuk meg, hogy ezekből az oldatokból 10 μl mennyiséget teszünk egy 96 lyukú mikrotiterlemez megfelelő vizsgálati lyukába (lásd a 2. és 3. táblázatot). A vizsgálati puffer elkészítését, a [^{3}H]-17β-ösztradiol eredeti törzsoldatának az ösztradiol specifikus aktivitásán alapuló kiszámítását, az oldatok elkészítését, valamint a koncentrációértékek meghatározását részletesen ismerteti a CERI protokoll (2).

16. A nem jelölt 17β-ösztradiol oldatait a 17β-ösztradiol 1 nM koncentrációjú törzsoldatából kell elkészíteni vizsgálati puffer hozzáadásával, nyolc növekvő koncentrációból álló, 0,625 μM-től 80 μM-ig terjedő induló koncentrációsorozatot készítve. A 0,0625 és 8 μM közötti végső vizsgálati koncentrációkat úgy kapjuk meg, hogy ezekből az oldatokból 10 μl mennyiséget elhelyezünk egy 96 lyukú mikrotiterlemez nem specifikus kötődés mérésére szolgáló vizsgálati lyukaiba (lásd a 2. és 3. táblázatot). A nem jelölt 17β-ösztradiol oldatainak elkészítését részletesen ismerteti a CERI protokoll (2).

▼M8

17. A receptor azon koncentrációját kell alkalmazni, amelyik 40 %-os (± 10 %) specifikus kötődést mutat (lásd a 12–13. pontot). A humán ösztrogénreceptor α oldatot jéghideg vizsgálati pufferrel kell elkészíteni közvetlenül felhasználás előtt, vagyis azt követően, hogy előkészítettük a teljes kötődést és a nem specifikus kötődést mérő, valamint a csak a radioaktív ligandumot tartalmazó lyukakat.

18. A 96 lyukú mikrotiterlemezeket a 2. táblázatban foglaltak szerint készítik el, a [^{3}H]-17β-ösztradiol egyes koncentrációértékeit 3 ismétlésben vizsgálva. A [^{3}H]-17β-ösztradiol, a nem jelölt 17β-ösztradiol, a puffer és a receptor térfogatát a 3. táblázat ismerteti.

2. táblázat

Mikrotiterlemez elrendezése a telítési kötési vizsgálathoz

	1. (*)	2. (*)	3. (*)	4. (*)	5. (*)	6. (*)	7. (*)	8. (*)	9. (*)	10	11. (**)	12. (**)
	A TB méréséhez			A NSB méréséhez			Csak a radioaktív ligandum meghatározásához				Nem jelölt E2 oldatai a lemez 4–6. oszlopához	[^{3}H]E2 oldatai a lemez 1–9. oszlopához
A	0,0313 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0313 nM [^{3}H] E2+ 0,0625 μM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 μM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0625 nM [^{3}H] E2+ 0,125 μM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 μM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [^{3}H] E2+ 0,25 μM E2+ ER			0,125 nM				2,5 μM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E2+ ER			0,250 nM [^{3}H] E2+ 0,5 μM E2+ ER			0,250 nM				5 μM	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E2+ ER			0,50 nM [^{3}H] E2+ 1 μM E2+ ER			0,50 nM				10 μM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E2+ ER			1,00 nM [^{3}H] E2+ 2 μM E2+ ER			1,00 nM				20 μM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E2+ ER			2,00 nM [^{3}H] E2+ 4 μM E2+ ER			2,00 nM				40 μM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E2+ ER			4,00 nM [^{3}H] E2+ 8 μM E2+ ER			4,00 nM				80 μM	40 nM

TB- teljes kötődés
NSB- nem specifikus kötődés
[^{3}H] E2- [^{3}H]17β-ösztradiol
E2- nem jelölt 17β-ösztradiol
(*) A táblázatban feltüntetett koncentrációértékek az egyes lyukakba adagolt végső koncentrációkat jelzik.
(**) A nem jelölt E2 és a [^{3}H]E2 oldatai külön lemezen is elkészíthetők.

▼M8

3. táblázat

A reagens térfogatértékei a telítési mikrotiterlemezhez

Sáv száma		1	2	3	4	5	6	7. (*)	8. (*)	9. (*)
Előkészítési folyamat lépései		TB lyukak			NSB lyukak			Csak radioaktív ligandum		
A fenti reagens lyukak összetevőinek térfogata és hozzáadási sorrendje	Puffer	60 µl			50 µl			90 µl		
	nem jelölt E2 a 2. táblázat 11. sávjából	—			10 µl			—		
	[^{3}H]E2 a 2. táblázat 12. sávjából	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			—		
Reagens összes térfogata		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubáció		**EZT KÖVETŐEN REAGENS KÉT ÓRÁS INKUBÁLÁSA**						Radioaktivitás mérése közvetlenül az elkészítés után. Nincs inkubáció.		
Kezelés 0,4 % DCC-vel		**Igen**			**Igen**			**Nem**		
A 0,4 %-os DCC térfogata		100 µl			100 µl			—		
Szűrés		Igen			Igen			Nem		
PERCENKÉNTI BOMLÁS MÉRÉSE										
A szcintillációs folyadékhoz hozzáadott mérendő térfogat		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Amennyiben a percenkénti bomlást mikrolemezekhez való számláló berendezéssel (LSC) mérik, akkor a csak a radioaktív ligandumot tartalmazó keverék nem készíthető el a TB és a NSB mérésére használt vizsgálati lemezen. A csak a radioaktív ligandumot tartalmazó keveréket külön lemezen kell elkészíteni.

(**) Ha a DCC-t centrifugálással különítik el, akkor a lyukak DCC-vel való átszennyezésének elkerülése érdekében az 50 µl felülúszót mikrolemezekhez való számláló berendezéssel kell mérni.

19. A teljes kötődés és a nem specifikus kötődés meghatározásához használt vizsgálati mikrotiterlemezeket két órán keresztül kell inkubálni, szobahőmérsékleten (22 °C és 28 °C között).

A humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiol mérése

20. A két órás inkubációt követően a humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiolt el kell különíteni a szabad [^{3}H]-17β-ösztradioltól, ehhez adjunk hozzá 100 µl 0,4 %-os jéghideg DCC szuszpenziót a lyukakhoz. Ezután a lemezeket 10 percre jégre kell helyezni, majd a reakciókeverék és a DCC szuszpenzió mikrotiterlemez szűrőn való átszűrésével el kell távolítani a DCC-t. A leszűrt anyagból 100 µl mennyiséget az LSC számláló berendezés csöveibe töltött szcintillációs folyadékba tesznek, és a folyadék szcintillációs számlálóval csövenként meghatározzák a (dpms-ben mért) percenkénti bomlást.

▼M8

21. Amennyiben nem áll rendelkezésre mikrolemez szűrő, a DCC eltávolítható centrifugálással is. A humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiolt tartalmazó 50 µl felülúszót különös óvatossággal kell kivenni, nehogy a DCC-hez hozzáérve átszennyezzük a lyukakat, majd szcintillációs számlálást végzünk.

22. A radioaktív ligandumot önmagában használják a vizsgálati lyukakba adagolt [^{3}H]-17β-ösztradiol percenkénti bomlásának (dpm) mérésére. A radioaktivitás mértékét közvetlenül az elkészítés után kell számszerűsíteni. Ezeket a lyukakat nem szabad inkubálni és DCC szuszpenzióval kezelni, tartalmukat közvetlenül a szcintillációs folyadékhoz kell adagolni. Ezek a mérőszámok azt jelzik, hogy mennyi dpms-ben kifejezett [^{3}H]-17β-ösztradiolt adtunk hozzá a teljes kötődést és a nem specifikus kötődést vizsgáló lyukakhoz.

Kompetitív kötési vizsgálat

23. A kompetitív kötési vizsgálat azt méri, hogy egy állandó koncentrációjú [^{3}H]-17β-ösztradiol milyen mértékben képes kötődni az adott vizsgálati vegyi anyag növekvő koncentrációja mellett. Egy vizsgálatmeneten belül minden koncentrációt három párhuzamos ismétlésben kell vizsgálni. Emellett minden vizsgálati vegyi anyagot három nem egyidejűleg végzett vizsgálatmenetben kell tesztelni. A vizsgálatot egy vagy több 96 lyukú mikrotiterlemezen kell elvégezni.

Kontrollok

24. A vizsgálat végrehajtása során minden egyes kísérletben párhuzamosan vizsgálni kell az oldószert és a kontrollanyagokat (a referenciaösztrogént, valamint a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Minden vizsgálatmenetben ugyanazon a lemezen vizsgálni kell a referenciaösztrogén teljes koncentrációgörbéjét és a kontrollanyagokat (vagyis a gyengén kötődő és a nem kötődő anyagot). Az összes többi lemeznek tartalmaznia kell i. az E2 és a gyengén kötődő anyag magas (maximális leszorítást, vagyis a radioaktívan jelölt ligandum szinte teljes leszorítását eredményező) és közepes (körülbelül IC_{50} hatást kiváltó) koncentrációját, három ismétlésben; ii. az oldószeres kontrollt és a nem specifikus kötődés mérését, három-három ismétlésben. A vizsgálati puffer, a [^{3}H]-17β-ösztradiol, a humán ösztrogénreceptor α és a vizsgálati vegyi anyag oldatainak elkészítési eljárását részletesen ismerteti a CERI protokoll (2).

Oldószeres kontroll:

25. Az oldószeres kontroll igazolja, hogy az oldószer nem lép kölcsönhatásra a vizsgálati rendszerrel, emellett méri a teljes kötődést (TB). Az ajánlott oldószer a DMSO. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációja nem oldható DMSO-ban, akkor alternatívaként etanol is használható. A végső vizsgálati lyukakba adagolt DMSO koncentrációja 2,05 % legyen, ez az érték legfeljebb 2,5 %-ra növelhető abban az esetben, ha a vizsgálati vegyi anyag az eredeti koncentrációban nem oldható. A DMSO 2,5 % fölötti koncentrációkban való használatát kerülni kell, mert az oldószer magasabb koncentrációi befolyásolhatják a vizsgálati eredményeket. A DMSO-ban nem, de etanolban oldódó vizsgálati vegyi anyagok esetében a vizsgálati eredmények befolyásolása nélkül az etanol legfeljebb 2 %-os koncentrációban alkalmazható.

Puffer kontroll:

26. A puffer kontroll (BC) nem tartalmazhatja sem az oldószert, sem a vizsgálati vegyi anyagot, csak a vizsgálat összes többi összetevőjét. A puffer kontroll eredményeit összevetik az oldószeres kontroll eredményeivel annak ellenőrzésére, hogy az alkalmazott oldószer nincs hatással a vizsgálati rendszerre.

▼M8

Erősen kötődő anyag (referenciaösztrogén)

27. A 17β-ösztradiol (CAS-száma: 50-28-2) az endogén ligandum, és magas affinitással kötődik az ösztrogénreceptor alfa altípusához. Minden humán ösztrogénreceptor α kompetitív kötési vizsgálathoz nem jelölt 17β-ösztradiollal el kell készíteni egy standard görbét, amely lehetővé teszi a variabilitás értékelését, ha a laboratóriumon belül egy későbbi időpontban ismét elvégzik a vizsgálatot. A nem jelölt 17β-ösztradiolból nyolc oldatot kell készíteni DMSO-ban és vizsgálati pufferben, a standard görbe létrehozásához a végső koncentrációkat a következő elosztásban kell a vizsgálati lyukakba helyezni: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8.5}$, 10^{-9}, $10^{-9.5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. A nem jelölt 17β–ösztradiol legmagasabb koncentrációja (1 μM) egyben a nem specifikus kötődést is jelzi. Ezt a koncentrációt a 4. táblázatban az „NSB” rövidítés különbözteti meg, bár ez is részét képezi a standard görbének.

Gyengén kötődő anyag

28. A vizsgálatba bele kell foglalni egy gyengén kötődő anyagot (a noretinodrel t (CAS-száma: 68-23-5) vagy alternatívaként a noretindront (CAS-száma: 68-22-4)), hogy igazolja az egyes kísérletek érzékenységét, és lehetővé tegye a variabilitás értékelését, ha a vizsgálat egy későbbi időpontban megismétlik. A gyengén kötődő anyagból nyolc oldatot kell készíteni DMSO-ban és vizsgálati pufferben, az anyagot a vizsgálati lyukakba a következő végső koncentrációkban kell elhelyezni: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} és 10^{-9} M.

Nem kötődő anyag

29. Negatív (nem kötődő) kontrollanyagként oktil-trietoxi-szilánt (OTES, CAS-száma: 2943-75-1) kell alkalmazni. Biztosítja azt, hogy a vizsgálat végrehajtása során detektálni lehessen a humán ösztrogénreceptor α-hoz nem kötődő vizsgálati vegyi anyagokat. A nem kötődő anyagból nyolc oldatot kell készíteni DMSO-ban és vizsgálati pufferben, az anyagot a vizsgálati lyukakba a következő végső koncentrációkban kell elhelyezni: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Alternatív nem kötődő anyagként di-n-butil-ftalát (DBP, CAS-száma: 84-72-2) használható, ezt az anyagot azonban csak 10^{-4} M koncentrációig tesztelték. A DBP-ról kimutatták, hogy a vizsgálat során a maximális oldható koncentrációja a 10^{-4} M.

A humán ösztrogénreceptor α koncentrációja

30. A receptort abban a mennyiségben kell alkalmazni, amelyik 40 %-os (± 10 %) specifikus kötődést vált ki (lásd a 3. függelék 12–13. pontját). A humán ösztrogénreceptor α oldatot közvetlenül használat előtt kell elkészíteni a funkcionális humán ösztrogénreceptor α jéghideg vizsgálati pufferben való hígításával.

[^{3}H]-17β-ösztradiol

31. A [^{3}H]-17β-ösztradiolt 0,5 nM végső koncentrációban kell a vizsgálati lyukakba helyezni.

Vizsgálati vegyi anyagok

32. Első lépésként oldhatósági vizsgálatot kell végezni az egyes vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági határértékének meghatározására, valamint a vizsgálati protokoll végrehajtása során alkalmazandó megfelelő koncentrációtartomány megállapítására. A vizsgálati vegyi anyagok oldhatósági határértékét először oldószerben kell meghatározni, majd a vizsgálati körülmények mellett meg kell erősíteni. A vizsgálatban tesztelt végső koncentrációjuk nem haladhatja meg az 1 mM-t. A koncentrációtartomány-behatároló vizsgálat magában foglal egy oldószeres kontrollt és a legmagasabb elfogadható koncentrációtól (pl. 1 mM, illetve az oldhatósági határértéktől függően ennél alacsonyabb koncentrációtól) induló, legalább 8 koncentrációból álló logaritmikus hígítási sorozatot, az esetlegesen tapasztalt zavarosságot vagy kicsapódást fel kell

▼M8

jegyezni (lásd még a 3. függelék 35. pontját). Miután meghatározták a vizsgálat során alkalmazandó koncentrációtartományt, a vizsgálati vegyi anyagokat 8 logaritmikus koncentrációban kell tesztelni, a koncentrációtartomány behatárolására szolgáló előzetes vizsgálatban meghatározott eloszlás szerint. A második és a harmadik kísérlet koncentrációértékeit szükség esetén úgy kell kiigazítani, hogy egy jobb koncentráció-válasz görbét adjanak.

33. A vizsgálati vegyi anyag oldatait megfelelő oldószerben kell elkészíteni (lásd a 3. függelék 25. pontját). Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációja sem DMSO-ban, sem etanolban nem oldható, és a hozzáadott oldószer mennyiségének növelése miatt a végső vizsgálathoz használt csőben az oldószer koncentrációja túllépné az elfogadható határértéket, a legmagasabb koncentráció az eggyel alacsonyabb koncentrációra csökkenthető. Ebben az esetben hozzá lehet adni egy további koncentrációértéket a koncentrációsorozat alacsonyabb értékeket tartalmazó végéhez. A sorozat többi koncentrációértékét változatlanul kell hagyni.

34. A vizsgálati vegyi anyag mikrotiterlemezbe adagolt oldatait figyelemmel kell követni, mivel a vizsgálati vegyi anyag a vizsgálati lyukakba helyezést követően kicsapódhat. A kicsapódást tartalmazó vizsgálati lyukak adatait ki kell zárni a görbeillesztésből, és fel kell jegyezni az adatok kizárásának okát.

35. Amennyiben valamely vizsgálati vegyi anyag log(IC_{50}) értékére vonatkozólag léteznek más forrásokból származó korábbi adatok, érdemes úgy beállítani a hígítást, hogy geometriailag közelebb (pl. 0,5 log egységnyire) helyezkedjenek el a log(IC_{50}) várt értéke körül. A végső eredményeknek a log(IC_{50}) mindkét oldalán kellő távolságban eloszló koncentrációkat kell mutatniuk, beleértve a görbe tetejét és alját, hogy a kötési görbét megfelelően lehessen jellemezni.

Vizsgálati lemez elrendezése

36. A mikrotiterlemezeken fel kell címkézni a hatszoros inkubálásnak alávetett oldószeres kontrollt, a referenciaösztrogén (E2) legmagasabb koncentrációját – amely egyben a nem specifikus kötődés (NSB) mutatója –, a puffer kontrollt, a háromszor inkubált nem kötődő kontrollanyag (oktil-trietoxi-szilán) mind a nyolc koncentrációját, a referenciaösztrogén (E2) hét alacsonyabb koncentrációját, a gyengén kötődő anyag (noretinodrel vagy noretindron) nyolc koncentrációját és minden egyes vizsgálati vegyi anyag (TC) nyolc koncentrációját. Az alábbi 4. táblázat példát szolgáltat egy olyan lemezelrendezésre, amely biztosítja a referenciaösztrogén és a kontrollanyagok teljes koncentrációgörbéjét. A többi mikrotiterlemez a vizsgálati vegyi anyag mérésére szolgál, emellett tartalmazniuk kell a lemezen belüli ellenőrzésre szolgáló kontrollanyagokat, vagyis i. az E2 és a gyengén kötődő anyag magas (maximális leszorítást eredményező) és közepes (körülbelül IC_{50} hatást kiváltó) koncentrációját, három ismétlésben; ii. az oldószeres kontroll (ami a teljes kötődés mutatója) és a nem specifikus kötődés mérését, hat-hat ismétlésben (lásd az 5. táblázatot). A 3.3. függelék példát szolgáltat arra, hogy milyen lemezelrendezést lehet alkalmazni a kompetitív vizsgálatban három ismeretlen vizsgálati vegyi anyag teszteléséhez. A lemezelrendezési ábrán, valamint a 4. és az 5. táblázatban feltüntetett koncentrációértékek az egyes vizsgálati lyukakba adagolt végső koncentrációkat jelzik. Az E2 maximális koncentrációja 1×10^{-7} M legyen, a gyengén kötődő anyag legmagasabb koncentrációja pedig az 1. lemezen használt legmagasabb koncentráció legyen. Az IC_{50} koncentrációját a laboratóriumnak kell meghatároznia, a kontrollanyagok adatait tartalmazó adatbázisa alapján. Ennek az értéknek közelítenie kell a validálási tanulmányok során nyert értékhez (lásd az 1. táblázatot).

▼**M8**

4. táblázat

A kompetitív kötési vizsgálathoz használt mikrotiterlemez azon elrendezése [1] [2], amely biztosítja a referenciaösztrogén és a kontrollanyagok teljes koncentrációgörbéjét (1. lemez)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Puffer kontroll és pozitív kontroll (E2)			Enyhén pozitív (Noretinodrel)			Negatív kontroll (OTES)			TB és NSB		
A	Üres (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (oldószeres kontroll) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1\times10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1\times10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Puffer kontroll		
F	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Üres (radioaktívhoz) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

([1]) Elrendezési minta minden kísérlethez alkalmazandó mikrotiterlemez standardokhoz.
([2]) Ez a mikrotiterlemez-elrendezés az előző részekben ismertetett standardokhoz alkalmazandó hígítási lemezen készített oldatok alapján készült.
Ebben a példában a gyengén kötődő anyag a noretinodrel (NE).
(*) ténylegesen üres, nem használt lyuk.
(**) a lyukat nem használják az inkubáció alatt, de használják a teljes hozzáadott radioaktivitás ellenőrzésére.

5. táblázat

A kompetitív kötési vizsgálathoz használt mikrotiterlemez elrendezése, a vizsgálati vegyi anyagokhoz (TC) és a lemezen belüli ellenőrzésre szolgáló kontrollanyagokhoz használt további lemezekhez

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1. vizsgálati vegyi anyag (TC-1)			2. vizsgálati vegyi anyag (TC-2)			3. vizsgálati vegyi anyag (TC-3)			Kontrollok		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 ($1\times10_{-7}$ M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E_2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10_{-4,5}$M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (Oldószeres kontroll)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

Ebben a példában a gyengén kötődő anyag a noretinodrel (NE).

▼M8

A kompetitív kötési vizsgálat elvégzése

37. A 6. táblázatban szereplő teljes kötődést vizsgáló és üres (radioaktívhoz) lyukak kivételével minden lyukba 50 µl vizsgálati puffert kell adagolni, amelyet össze kell keverni 10 µl oldószerrel vagy referenciaösztrogénnel (E2), gyengén kötődő anyaggal, nem kötődő anyaggal, vizsgálati vegyi anyagokkal, majd 10 µl 5 nM koncentrációjú [^{3}H]-17β-ösztradiol oldattal. Ezt követően minden egyes lemezhez 30 µl jéghideg receptoroldatot kell adni, és a keveréket óvatosan össze kell keverni. Utolsó reagensként a humán ösztrogénreceptor α oldatot kell hozzáadni. A vizsgálati mikrotiterlemezeket két órán keresztül kell inkubálni, szobahőmérsékleten (22 °C és 28 °C között).

6. táblázat

A humán ösztrogénreceptor kompetitív kötési vizsgálat mikrotiterlemezeire helyezett vizsgálati összetevők térfogata

A sávok előkészítésének lépései		Nem TB lyukak	TB lyukak	Üres (radioaktívhoz)
A fenti reagens lyukak összetevőinek térfogata és hozzáadási sorrendje	Szobahőmérsékletű vizsgálati puffer	50 µl	60 µl	90 µl
	Nem jelölt E2, gyengén kötődő anyag, nem kötődő anyag, oldószer és vizsgálati vegyi anyagok (*)	10 µl	—	—
	[^{3}H]-17β-ösztradiol a végső, 0.5 nM (vagyis 5 nM) koncentráció biztosításához	10 µl	10 µl	10 µl
	hrERα a meghatározott koncentrációban (lásd a 12–13. pontot)	30 µl	30 µl	—
Teljes térfogat az egyes vizsgálati lyukakban		100 µl	100 µl	100 µl

(*) megfelelően előkészítve ahhoz, hogy az oldószer elfogadható koncentrációján belül elő lehessen állítani a végső koncentrációt.

38. Ezt követően a 3. függelék 21–23. pontjában a telítési kötési vizsgálatnál ismertetett módon minden lyukhoz hozzáadnak 100 µl jéghideg DCC szuszpenziót, hogy elkülönítsék a humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiolt a szabad [^{3}H]-17β-ösztradioltól, majd megmérik a humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődött [^{3}H]-17β-ösztradiolok mennyiségét.

39. A G10–12 és H10–12 lyukakban (amelyeket a 4. táblázat üres (radioaktívhoz) címen jelöl) mérik a 10 µl mennyiségű [^{3}H] jelölt ösztradiol percenkénti bomlását. A 10 µl-nek megfelelő mennyiséget közvetlenül a szcintillációs folyadékhoz kell adni.

Elfogadhatósági kritériumok

Telítési kötési vizsgálat

40. A specifikus kötődési görbének a [^{3}H]-17β-ösztradiol fokozódó koncentrációban való alkalmazása miatt egy platóban kell végződnie, ami jelzi a humán ösztrogénreceptor α ligandummal való telítettségét.

41. A [^{3}H]-17β-ösztradiol 0,5 nM koncentrációjánál megfigyelt specifikus kötődésnek a minden vizsgálatmenetben hozzáadott teljes radioaktivitás mért átlagának 30–50 %-os elfogadhatósági tartományán belül kell maradnia. E tartománytól való esetenkénti kis mértékű elérés még elfogadható, de ha a vizsgálatmenetek eredménye következetesen kívül esik ezen a tartományon, illetve ha egy adott vizsgálatmenet eredménye jelentősen eltér tőle, akkor ki kell igazítani a fehérjekoncentrációt és meg kell ismételni a telítési vizsgálatot.

▼M8

42. Az adatoknak egy lineáris Scatchard-plotot kell alkotniuk.

43. A nem specifikus kötődés nem lehet túlzott mértékű. A nem specifikus kötődés értéke jellemzően nem érheti el a teljes kötődés 35 %-át. Ugyanakkor a nem specifikus kötődés aránya esetenként meghaladhatja ezt a határértéket, ha a radioaktívan jelölt 17β-ösztradiol legalacsonyabb vizsgált koncentrációjánál nagyon alacsony percenkénti bomlást mérnek.

Kompetitív kötési vizsgálat

44. A nem jelölt 17β-ösztradiol növekvő koncentrációban leszorítja a [^{3}H]-17β-ösztradiolt a receptorról, és ez összhangban van az egy kötőhelyes kompetitív kötéssel.

45. A referenciaösztrogén (vagyis a 17β-ösztradiol) IC_{50} és K_d értékének nagyjából egyenlőnek kell lennie a [^{3}H]-17β-ösztradiol moláris koncentrációjával; a disszociációs állandót a telítési kötési vizsgálatban határozzák meg.

46. A teljes specifikus kötődésnek rendre a 40 ± 10 %-os elfogadhatósági tartományon belül kell maradnia, ha a vizsgálatmenetekben az egyes lyukakhoz hozzáadott összes radioaktívan jelölt anyag átlagos mért koncentrációja 0,5 nM volt. E tartománytól való esetenkénti kis mértékű elérés még elfogadható, de ha a vizsgálatmenetek eredménye következetesen kívül esik ezen a tartományon, illetve ha egy adott vizsgálatmenet eredménye jelentősen eltér ettől, akkor ki kell igazítani a fehérjekoncentrációt.

47. Az oldószer nem módosíthatja a vizsgálat érzékenységét vagy megismételhetőségét. Az oldószeres kontroll (Tb-ként jelölve) eredményeit összevetik a puffer kontroll eredményeivel annak ellenőrzésére, hogy az alkalmazott oldószer nincs hatással a vizsgálati rendszerre. Amennyiben a TB kontroll és a puffer kontroll hasonló eredményre vezet, akkor az oldószer nem befolyásolja a vizsgálatot.

48. A nem kötődő anyag maximális 10^{-3} M (OTES) vagy 10^{-4} M (DBP) koncentrációnál legfeljebb 25 % [^{3}H]-17β-ösztradiolt szoríthat le a humán ösztrogénreceptor α-ról.

49. A CERI humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat validálási tanulmányából származó adatok alapján a referenciaösztrogénre és két gyengén kötődő anyagra (pl. noretinodrel , noretindron) vonatkozva teljesítménykritériumokat dolgoztak ki (2. referencia N. függeléke). A validálási tanulmányban részt vevő négy laboratórium 95 %-os konfidenciaintervallumot adott meg az átlag ± SD (n) értékéhez minden kontroll vizsgálatmenetben. 95 %-os konfidenciaintervallumot határoztak meg a görbeillesztési paraméterekre (vagyis a görbe tetejére, aljára, a Hill-meredekségre és a Log IC_{50}-re), a referenciaösztrogénre és a gyengén kötődő anyagokra, valamint a gyengén kötődő anyagok referenciaösztrogénhez viszonyított Log_{10}RBA értékére vonatkozólag. Az 1. táblázat ismerteti a görbeillesztési paraméterek várt tartományait, amelyek használhatók teljesítménykritériumként. A gyakorlatban az IC_{50} tartománya a receptor preparátum kísérleti úton meghatározott K_d értékétől és a ligandum vizsgálatban használt koncentrációjától függően kissé változó lehet.

50. A potenciális vizsgálati vegyi anyagok széles skálája, valamint potenciális affinitásuk és az eredmények (pl. teljes görbe, részleges görbe, nem illeszthető görbe) változatossága miatt a vizsgálati vegyi anyagok görbeillesztési paramétereire nézve nem dolgoztak ki teljesítménykritériumokat. Egy adott vizsgálati vegyi anyag egyes vizsgálatmeneteiből származó eredmények értékelése során azonban szakmai megítélés alapján kell dönteni. A vizsgálati vegyi anyag megfelelő koncentrációtartományát kell használni ahhoz, hogy

▼M8

egyértelműen meg lehessen határozni a kompetitív görbe (pl. 90–100 %-os kötődést jelző) platóját. A vizsgálati vegyi anyag különböző koncentrációin történő ismétlések eltérései közötti és a három független vizsgálatmenet közötti variabilitásnak észszerű mértéken belül kell maradnia és tudományosan védhetőnek kell lennie. Egy adott vizsgálati vegyi anyag minden vizsgálatmenetében elvégzett kontrollok eredményeinek meg kell közelíteniük a CERI vizsgálat teljesítménymutatóit, és összhangban kell lenniük minden releváns laboratórium történeti kontrolladataival.

AZ ADATOK ELEMZÉSE

Telítési kötési vizsgálat

51. Mérni kell mind a teljes, mind a nem specifikus kötődést. Ezen értékek alapján számolható ki a [^{3}H]-17β-ösztradiol növekvő koncentrációin létrejött egyensúlyi állapotokban kiváltott specifikus kötődés úgy, hogy a teljes kötődésből kivonják a nem specifikus kötődést. A specifikus kötődés és a [^{3}H]-17β-ösztradiol koncentrációi közötti függvényt ábrázoló grafikon a maximális specifikus kötődésre jellemző platóban végződik, amely azt az állapotot jelzi, amikor a humán ösztrogénreceptor α telítődött [3H]-17β-ösztradiollal. Emellett az adatok elemzése dokumentálja, hogy a [^{3}H]-17β-ösztradiol egyetlen, nagy affinitású kötőhelyhez kapcsolódik. A nem specifikus, a teljes és a specifikus kötődést egy telítési kötési görbén kell ábrázolni. Az adatokat a továbbiakban nem-lineáris regressziós analízissel kell elemezni (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), végül pedig egy Scatchard-plot grafikonon ábrázolni.

52. Az adatelemzés során kizárólag a teljes kötődési adatok alapján meg kell határozni a B_{max} és a K_d értékét, feltételezve, hogy a nem specifikus kötődés lineáris, más módszer alkalmazását indokolni kell. A legjobban illeszkedő görbét pedig robusztus regresszióval kell meghatározni, az ettől való eltérést indokolni kell. A robusztus regresszió alkalmazásának módszerét meg kell adni. Abban az esetben, ha a B_{max} és a K_d értékét a telítési kötési adatok alapján határozzák meg, mindig korrigálni kell a ligandum koncentrációjának csökkenését (például a Swillens, 1995 által leírt módszerrel).

Kompetitív kötési vizsgálat

53. A kompetitív kötési görbe a [^{3}H]-17β-ösztradiol specifikus kötődésének és a kompetítor ($\log_{10}$ egységekben feltüntetett) koncentrációjának összefüggését ábrázolja. A vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely meggátolja a [^{3}H]-17β-ösztradiol maximális specifikus kötődésének 50 %-át, az IC_{50} érték.

54. A pozitív kontrollanyagok (pl. a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag) becsült log(IC_{50}) értékének meghatározásához egy megfelelő nem-lineáris görbeillesztő szoftvert kell használni, amely illeszteni tudja egy négyparaméteres Hill-egyenlet görbéjét (pl. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). A görbék illesztése során a görbe tetejét, alját, meredekségét jelző értékeket és a log(IC_{50}) értékét általában szabadon ábrázolják. A legjobban illeszkedő görbét robusztus regresszióval kell meghatározni, az ettől való eltérést indokolni kell. A ligandum csökkenését nem kell korrigálni. A kezdeti analízist követően minden kötési görbét ellenőrizni kell, hogy megfelelően illeszkedik-e a modellre. A gyengén kötődő anyag relatív kötési affinitását a gyengén kötődő anyag log (IC_{50}) értékének a 17β-ösztradiol log (IC_{50}) értékéhez viszonyított arányaként kell meghatározni. A pozitív kontrollok és a nem kötődő kontroll eredményeit a vizsgálat e 3. függelék 44–49. pontjában ismertetett teljesítménymutatói alapján kell értékelni.

▼M8

55. Az összes vizsgálati vegyi anyag adatait lépésenként kell elemezni, biztosítva ezáltal az adatok megfelelő elemzését és a kompetitív kötési görbék helyes osztályozását. Javasolt vizsgálati anyagonként minden vizsgálat megkezdésekor egy szabványosított adatelemzést végezni, amely megegyezik a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag kontrolljainál alkalmazott analízissel (lásd e 3. függelék 54. pontját). Az adatelemzés végeztével technikailag ellenőrizni kell a görbeillesztési paramétereket, valamint vizuálisan is ellenőrizni kell, hogy az adatok mennyire illeszkednek az egyes vizsgálatmenetek kompetitív kötési görbéjéhez. Amennyiben a technikai ellenőrzés során megfigyelhető a specifikusan kötődő [^{3}H]-17β-ösztradiol arányának koncentrációfüggő csökkenése, a vizsgálati vegyi anyagok egyes koncentrációit tartalmazó ismétlések közötti csekély eltérés és a három vizsgálatmenet görbeillesztési paramétereinek következetessége jó indikátorai annak, hogy a vizsgálatot és az adatelemzést megfelelően hajtották végre.

Az adatok értelmezése

56. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, a vizsgálati vegyi anyag humán ösztrogénreceptor α-hoz kötődő anyagnak minősül, ha az adatokra illeszthető kötési görbe, és a válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 50 %-a alatt helyezkedik el (1. ábra).

57. Amennyiben valamennyi elfogadhatósági kritérium teljesül, valamely vizsgálati vegyi anyag akkor tekinthető humán ösztrogénreceptor α-hoz nem kötődő anyagnak, ha:

— az adataira illeszthető kötési görbe, és az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 75 %-a felett helyezkedik el, vagy

— az adataira nem illeszthető kötési görbe, és az adatok koncentrációcsoportjai közül a legalsó simítatlan átlagos kötési arány 75 % felett helyezkedik el.

58. A vizsgálati vegyi anyag válasza akkor minősül kétértelműnek, ha a fenti feltételek egyike sem teljesül (vagyis az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 76 és 51 % között helyezkedik el).

7. táblázat

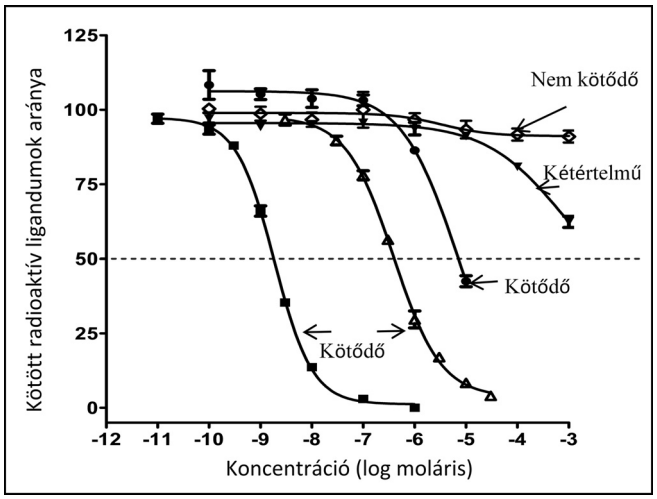
A vizsgálati vegyi anyagok kompetitív kötési görbén alapuló osztályba sorolásának kritériumai

Besorolás	Kritériumok
Kötődő[a]	Az adatokra illeszthető kötési görbe. A **válaszgörbe legalsó pontja az adattartomány 50 %-a alatt helyezkedik el.**
Nem kötődő[b]	Ha az adatokra illeszthető kötési görbe, az **adattartományra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 75 %-a felett helyezkedik el.** Ha az adatokra nem illeszthető kötési görbe, az **adatok koncentrációcsoportjai közül a legalsó simítatlan átlagos kötési arány 75 % felett helyezkedik el.**
Kétértelmű[c]	Bármely vizsgálatmenet, amelynek eredménye sem a kötődő, sem a nem kötődő kategóriába nem sorolható (pl. az adatokra illesztett válaszgörbe legalsó pontja 76 és 51 % között helyezkedik el).

▼M8

1. ábra

Példák a vizsgálati vegyi anyagok kompetitív kötési görbén alapuló osztályba sorolására.



59. A vizsgálati vegyi anyag egy laboratóriumon belül elvégzett több vizsgálatmenetének eredményét összesítik úgy, hogy egy számértéket társítanak minden vizsgálatmenethez, majd meghatározzák a vizsgálatmenetek átlagát (lásd a 8. táblázatot). A laboratórium vizsgálatmeneteinek összesített eredményét azután összevetik az egyes vizsgálati vegyi anyagok várt besorolásával.

8. táblázat

Az egy laboratóriumon belül több vizsgálatmenetben vizsgálati vegyi anyagok osztályba sorolásának módszere,

Számérték társítása az egyes vizsgálatmenetekhez:	
Besorolás	**Számérték**
Kötődő	2
Kétértelmű	1
Nem kötődő	0

Besorolás a vizsgálatmenetek átlagos számértéke alapján:

Besorolás	**Számérték**
Kötődő	Átlag ≥ 1,5
Kétértelmű	0,5 ≤ Átlag < 1,5
Nem kötődő	Átlag < 0,5

VIZSGÁLATI JELENTÉS

60. Lásd a vizsgálati módszer „A humán ÖSZTROGÉNRECEPTOR-KÖTÉSI VIZSGÁLAT ÖSSZETEVŐI” részének 24. pontját.

▼**M8**

3.1. függelék

Szakkifejezések Listája

[^{3}H]E2: radioaktív tríciummal jelölt 17β-ösztradiol.

DCC: dextránbevonatú aktívszén.

E2: nem jelölt 17β-ösztradiol (semleges).

Vizsgálati puffer: 10 mM trisz-HCl (pH-értéke 7,4), amely a következőket tartalmazza: 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO3, 10 % glicerin, 0,2 mM leupeptin, 1 mM ditiotreitol és 10 mg/ml szarvasmarha szérum albumin.

hrERα: humán rekombináns ösztrogénreceptor alfa (ligandumkötő domén).

Ismétlés: egyike azon lyukaknak, amelyek azonos mintát tartalmaznak azonos koncentrációban, és vizsgálatuk egy adott vizsgálatmeneten belül, párhuzamosan zajlik. E protokoll keretén belül a vizsgálati vegyi anyagok minden koncentrációját három ismétlésben tesztelik; vagyis a vizsgálati vegyi anyagok minden koncentrációját egyidejűleg három ismétlésben vizsgálják.

Vizsgálatmenet: párhuzamosan vizsgált mikrotiterlemez minden mintája, amely minden szükséges információt biztosít a vizsgálati vegyi anyagok humán ösztrogénreceptor α-hoz való kötődésének jellemzéséhez (nevezetesen a vizsgálati lyukba adagolt összes [^{3}H]-17β-ösztradiol, a [^{3}H]-17β-ösztradiol maximális kötődése a hrERα-hoz, nem specifikus kötődés és a vizsgálati vegyi anyagok különböző koncentrációi által előidézett teljes kötődés). Egy vizsgálatmenet állhat koncentrációnként egyetlen vizsgálati lyukból is (vagyis egy ismétlésből), mivel azonban ez a protokoll három ismétlésben való tesztelést ír elő, egy vizsgálatmenet koncentrációnként három vizsgálati lyukat foglal magában. Emellett a protokoll meghatározza azt is, hogy vegyi anyagonként három független (azaz nem egyidejűleg lefolytatott) vizsgálatmenetre van szükség.

▼**M8**

3.2. függelék

MINTÁK ELRENDEZÉSE A KOMPETITÍV KÖTÉSI VIZSGÁLATHOZ

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	A1	1	Üres	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
Sz	A2	2	Üres	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
Sz	A3	3	Üres	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
Sz	B1	1	nem jelölt E2	Sz	S1	1,00 E^{-10}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-11}
Sz	B2	2	nem jelölt E2	Sz	S1	1,00 E^{-10}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-11}
Sz	B3	3	nem jelölt E2	Sz	S1	1,00 E^{-10}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-11}
Sz	C1	1	nem jelölt E2	Sz	S2	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
Sz	C2	2	nem jelölt E2	Sz	S2	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
Sz	C3	3	nem jelölt E2	Sz	S2	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
Sz	D1	1	nem jelölt E2	Sz	S3	3,16 E^{-9}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-10}
Sz	D2	2	nem jelölt E2	Sz	S3	3,16 E^{-9}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-10}
Sz	D3	3	nem jelölt E2	Sz	S3	3,16 E^{-9}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-10}
Sz	E1	1	nem jelölt E2	Sz	S4	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	E2	2	nem jelölt E2	Sz	S4	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	E3	3	nem jelölt E2	Sz	S4	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	F1	1	nem jelölt E2	Sz	S5	3,16 E^{-8}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-9}
Sz	F2	2	nem jelölt E2	Sz	S5	3,16 E^{-8}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-9}
Sz	F3	3	nem jelölt E2	Sz	S5	3,16 E^{-8}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-9}
Sz	G1	1	nem jelölt E2	Sz	S6	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}

▼**M8**

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	G2	2	nem jelölt E2	Sz	S6	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
Sz	G3	3	nem jelölt E2	Sz	S6	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
Sz	H1	1	nem jelölt E2	Sz	S7	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
Sz	H2	2	nem jelölt E2	Sz	S7	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
Sz	H3	3	nem jelölt E2	Sz	S7	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
Sz	A4	1	noretinodrel	NE	WP1	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	A5	2	noretinodrel	NE	WP1	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	A6	3	noretinodrel	NE	WP1	1,00 E^{-08}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	B4	1	noretinodrel	NE	WP2	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
Sz	B5	2	noretinodrel	NE	WP2	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
Sz	B6	3	noretinodrel	NE	WP2	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
Sz	C4	1	noretinodrel	NE	WP3	3,16 E^{-7}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-8}
Sz	C5	2	noretinodrel	NE	WP3	3,16 E^{-7}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-8}
Sz	C6	3	noretinodrel	NE	WP3	3,16 E^{-7}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-8}
Sz	D4	1	noretinodrel	NE	WP4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
Sz	D5	2	noretinodrel	NE	WP4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
Sz	D6	3	noretinodrel	NE	WP4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
Sz	E4	1	noretinodrel	NE	WP5	3,16 E^{-6}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-7}
Sz	E5	2	noretinodrel	NE	WP5	3,16 E^{-6}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-7}
Sz	E6	3	noretinodrel	NE	WP5	3,16 E^{-6}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-7}

▼**M8**

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	F4	1	noretinodrel	NE	WP6	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	F5	2	noretinodrel	NE	WP6	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	F6	3	noretinodrel	NE	WP6	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	G4	1	noretinodrel	NE	WP7	3,16 E^{-5}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-6}
Sz	G5	2	noretinodrel	NE	WP7	3,16 E^{-5}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-6}
Sz	G6	3	noretinodrel	NE	WP7	3,16 E^{-5}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-6}
Sz	H4	1	noretinodrel	NE	WP8	3,16 E^{-4}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-5}
Sz	H5	2	noretinodrel	NE	WP8	3,16 E^{-4}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-5}
Sz	H6	3	noretinodrel	NE	WP8	3,16 E^{-4}	30	50	10	10	100	3,2 E^{-5}
Sz	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
Sz	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
Sz	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
Sz	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
Sz	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
Sz	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
Sz	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
Sz	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
Sz	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
Sz	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
Sz	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}

▼**M8**

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
Sz	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
Sz	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
Sz	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
Sz	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
Sz	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
Sz	H7	1	OTES	N	OTES8DB-P7	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
Sz	H8	2	OTES	N	OTES88	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
Sz	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
Sz	A10	1	teljes kötődés	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
Sz	A11	2	teljes kötődés	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
Sz	A12	3	teljes kötődés	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
Sz	B10	4	teljes kötődés	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	-
Sz	B11	5	teljes kötődés	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
Sz	B12	6	teljes kötődés	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
Sz	C10	1	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S1	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	C11	2	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S2	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	C12	3	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S3	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	D10	4	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S4	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	D11	5	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}

▼**M8**

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	D12	6	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S6	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
Sz	E10	1	Puffer kontroll	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
Sz	E11	2	Puffer kontroll	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
Sz	E12	3	Puffer kontroll	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
Sz	F10	4	Puffer kontroll	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
Sz	F11	5	Puffer kontroll	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
Sz	F12	6	Puffer kontroll	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
Sz	G10 (*)	1	Üres (radio-aktívhoz)	Radio-aktív	H1	—	90	—	10	—	100	-
Sz	G11 (*)	2	Üres (radio-aktívhoz)	Radio-aktív	H2	—	90	—	10	—	100	—
Sz	G12 (*)	3	Üres (radio-aktívhoz)	Radio-aktív	H3	—	90	—	10	—	100	—
Sz	H10 (*)	4	Üres (radio-aktívhoz)	Radio-aktív	H4	—	90	—	10	—	100	—

▼**M8**

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
Sz	H11 (*)	5	Üres (radio-aktívhoz)	Radio-aktív	H5	—	90	—	10	—	100	—
Sz	H12	6	Üres (radio-aktívhoz)	Radio-aktív	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	1. ismeretlen	U1	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
P1	A2	2	1. ismeretlen	U1	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
P1	A3	3	1. ismeretlen	U1	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
P1	B1	1	1. ismeretlen	U1	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	B2	2	1. ismeretlen	U1	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	B3	3	1. ismeretlen	U1	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	C1	1	1. ismeretlen	U1	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
P1	C2	2	1. ismeretlen	U1	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
P1	C3	3	1. ismeretlen	U1	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
P1	D1	1	1. ismeretlen	U1	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	D2	2	1. ismeretlen	U1	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	D3	3	1. ismeretlen	U1	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	E1	1	1. ismeretlen	U1	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	E2	2	1. ismeretlen	U1	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	E3	3	1. ismeretlen	U1	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	F1	1	1. ismeretlen	U1	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
P1	F2	2	1. ismeretlen	U1	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
P1	F3	3	1. ismeretlen	U1	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
P1	G1	1	1. ismeretlen	U1	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	G2	2	1. ismeretlen	U1	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	G3	3	1. ismeretlen	U1	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	H1	1	1. ismeretlen	U1	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
P1	H2	2	1. ismeretlen	U1	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}

▼**M8**

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
P1	H3	3	1. ismeretlen	U1	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
P1	A4	1	2. ismeretlen	U2	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
P1	A5	2	2. ismeretlen	U2	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
P1	A6	3	2. ismeretlen	U2	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
P1	B4	1	2. ismeretlen	U2	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	B5	2	2. ismeretlen	U2	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	B6	3	2. ismeretlen	U2	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	C4	1	2. ismeretlen	U2	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
P1	C5	2	2. ismeretlen	U2	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
P1	C6	3	2. ismeretlen	U2	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
P1	D4	1	2. ismeretlen	U2	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	D5	2	2. ismeretlen	U2	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	D6	3	2. ismeretlen	U2	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	E4	1	2. ismeretlen	U2	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	E5	2	2. ismeretlen	U2	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	E6	3	2. ismeretlen	U2	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	F4	1	2. ismeretlen	U2	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
P1	F5	2	2. ismeretlen	U2	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
P1	F6	3	2. ismeretlen	U2	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
P1	G4	1	2. ismeretlen	U2	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	G5	2	2. ismeretlen	U2	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	G6	3	2. ismeretlen	U2	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	H4	1	2. ismeretlen	U2	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
P1	H5	2	2. ismeretlen	U2	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
P1	H6	3	2. ismeretlen	U2	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
P1	A7	1	3. ismeretlen	U3	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
P1	A8	2	3. ismeretlen	U3	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}

▼**M8**

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
P1	A9	3	3. ismeretlen	U3	1	1,00 E^{-9}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-10}
P1	B7	1	3. ismeretlen	U3	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	B8	2	3. ismeretlen	U3	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	B9	3	3. ismeretlen	U3	2	1,00 E^{-8}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-9}
P1	C7	1	3. ismeretlen	U3	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
P1	C8	2	3. ismeretlen	U3	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
P1	C9	3	3. ismeretlen	U3	3	1,00 E^{-7}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-8}
P1	D7	1	3. ismeretlen	U3	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	D8	2	3. ismeretlen	U3	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	D9	3	3. ismeretlen	U3	4	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-7}
P1	E7	1	3. ismeretlen	U3	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	E8	2	3. ismeretlen	U3	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	E9	3	3. ismeretlen	U3	5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	F7	1	3. ismeretlen	U3	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
P1	F8	2	3. ismeretlen	U3	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
P1	F9	3	3. ismeretlen	U3	6	1,00 E^{-4}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-5}
P1	G7	1	3. ismeretlen	U3	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	G8	2	3. ismeretlen	U3	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	G9	3	3. ismeretlen	U3	7	1,00 E^{-3}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-4}
P1	H7	1	3. ismeretlen	U3	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
P1	H8	2	3. ismeretlen	U3	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
P1	H9	3	3. ismeretlen	U3	8	1,00 E^{-2}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-3}
P1	A10	1	E2 kontroll (max)	Sz	$E2_{max}1$	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,00 E^{-7}
P1	A11	2	E2 kontroll (max)	Sz	$E2_{max}$ 2	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,00 E^{-7}
P1	A12	3	E2 kontroll (max)	Sz	$E2_{max}$ 3	1,00 E^{-6}	30	50	10	10	100	1,00 E^{-7}
P1	B10	1	E2 kontroll (IC_{50})	Sz	$E2IC_{50}1$	$E2IC_{50}$x10	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$

▼**M8**

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
P1	B11	2	E2 kontroll (IC_{50})	Sz	$E2IC_{50}2$	$E2IC_{50}x10$	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	B12	3	E2 kontroll (IC_{50})	Sz	$E2IC_{50}3$	$E2IC_{50}x10$	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	C10	1	NE kontroll (max)	Sz	Ne_{max} 1	1,00 $E^{-3,5}$	30	50	10	10	100	1,00 $E^{-4,5}$
P1	C11	2	NE kontroll (max)	Sz	Ne_{max} 2	1,00 $E^{-3,5}$	30	50	10	10	100	1,00 $E^{-4,5}$
P1	C12	3	NE kontroll (max)	Sz	Ne_{max} 3	1,00 $E^{-3,5}$	30	50	10	10	100	1,00 $E^{-4,5}$
P1	D10	1	NE kontroll (IC_{50})	Sz	$NEIC_{50}1$	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D11	2	NE kontroll (IC_{50})	Sz	$NEIC_{50}2$	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D12	3	NE kontroll (IC_{50})	Sz	$NEIC_{50}3$	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	E10	1	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S1	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	E11	2	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S2	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	E12	3	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S3	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	F10	4	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S4	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	F11	5	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S5	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	F12	6	nem jelölt E2 (magas)	NSB	S6	1,00 E^{-5}	30	50	10	10	100	1,0 E^{-6}
P1	G10	1	teljes kötődés	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	teljes kötődés	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	teljes kötődés	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—

▼**M8**

Lemez	Pozíció	Ismétlés	Lyuk típusa	Lyuk kódja	Koncentráció kódja	Kompetítor induló koncentrációja (M)	hrER törzs (µl)	Puffer térfogata (µl)	Nyomjelző (radioaktív E2) térfogata (µL)	Hígítási lemezről adagolt térfogat (µL)	Végső térfogat (µl)	Kompetítor végső koncentrációja (M)
P1	H10	4	teljes kötődés	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	teljes kötődés	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	teljes kötődés	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	-

(*) A „radioaktív” kifejezéssel jelölt lyukak az inkubálás alatt üresek. A 10 µl-t kizárólag a szcintillációs számlálás céljából adják hozzá a lyukakhoz.

▼M8

4. függelék

A HUMÁN ÖSZTROGÉNRECEPTOR KOMPETITÍV KÖTÉSI VIZSGÁLATBÓL NYERT ADATOK ELEMZÉSÉNEK SZEMPONTJAI

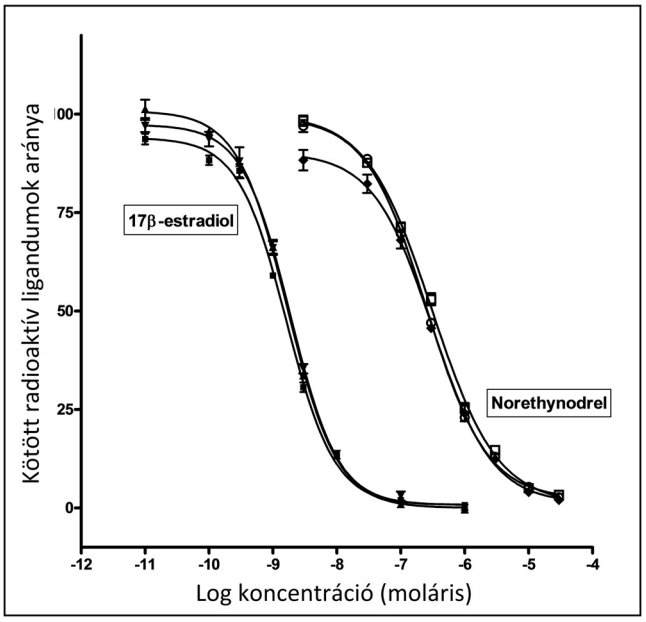
1. A humán ösztrogénreceptor α kompetitív kötési vizsgálat azt méri, hogy milyen mértékben képes egy állandó koncentrációban alkalmazott [^{3}H]-17β-ösztradiol kötődni egy adott vizsgálati vegyi anyag növekvő koncentrációjának jelenlétében. A kompetitív kötési görbe a [^{3}H]-17β-ösztradiol specifikus kötődésének és a kompetítor ($\log_{10}$ egységekben feltüntetett) koncentrációjának összefüggését ábrázolja. A vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely meggátolja a [^{3}H]-17β-ösztradiol maximális specifikus kötődésének 50 %-át, az IC_{50}.

A referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag adatainak elemzése (1)

2. A kontroll vizsgálatmenetekből nyert adatokat (vagyis a [^{3}H]-17β-ösztradiol specifikus kötődésének arányát és a kontrollanyag logaritmikus koncentrációit) a további elemzés céljára transzformálják. A pozitív kontrollanyagok (pl. a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag) becsült log(IC_{50}) értékének meghatározásához egy megfelelő nem-lineáris görbeillesztő szoftvert kell használni, amely meg tudja rajzolni a négyparaméteres Hill-egyenlet görbéjét (pl. BioSoft; GraphPad Prism) (2). A görbe illesztése során a görbe tetejét, alját, meredekségét jelző értékeket és a log(IC_{50}) értékét általában szabadon ábrázolják. A legjobban illeszkedő görbét robusztus regresszióval kell meghatározni, az ettől való eltérést indokolni kell. A robusztus regresszió alkalmazásának módszerét meg kell adni. A Freyberger–Wilson és a CERI humán ösztrogénreceptor vizsgálata során nem kellett korrigálni a ligandum csökkenését, de ha szükséges, fontolóra vehető a korrekció alkalmazása. A kezdeti analízist követően minden kötési görbét ellenőrizni kell, hogy megfelelően illeszkedik-e a modellre. A gyengén kötődő anyag relatív kötési affinitását a gyengén kötődő anyag log (IC_{50}) értékének a 17β-ösztradiol log (IC_{50}) értékéhez viszonyított arányaként lehet meghatározni. A pozitív kontrollok és a nem kötődő kontroll eredményeit a vizsgálati módszerben meghatározott vizsgálati teljesítménymutatók és elfogadhatósági kritériumok szerint kell értékelni (20. pont, a 2. függelék (Freyberger–Wilson vizsgálat) 41–51. pontja és a 3. függelék (CERI vizsgálat) 41–51. pontja). A referenciaösztrogén és gyengén kötődő anyag 3 vizsgálatmenetére vonatkozólag az 1. ábra hoz példákat.

1. ábra

Példák a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag kompetitív kötési görbéire



▼M8

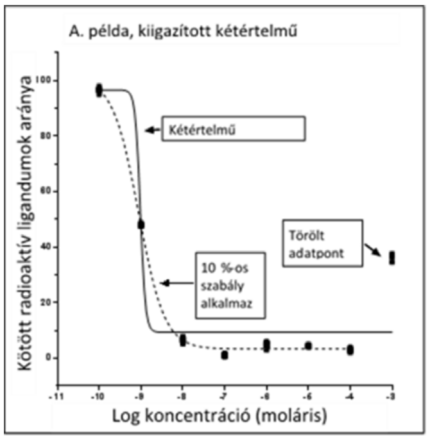
A vizsgálati vegyi anyagok adatainak elemzése

3. Az összes vizsgálati vegyi anyag adatait lépésenként kell elemezni, biztosítva ezáltal az adatok megfelelő elemzését és a kompetitív kötési görbék helyes osztályozását. Vizsgálati vegyi anyagonként minden vizsgálatmenet megkezdésekor egy szabványosított adatelemzést kell végezni, amely megegyezik a referenciaösztrogén és a gyengén kötődő anyag kontrolljainál alkalmazott analízissel. Az adatelemzés végeztével technikailag ellenőrizni kell a görbeillesztési paramétereket, valamint vizuálisan is ellenőrizni kell, hogy az adatok mennyire illeszkednek az egyes vizsgálatmenetek kompetitív kötési görbéjéhez. Amennyiben a technikai ellenőrzés során megfigyelhető a specifikusan kötődő [^{3}H]-17β-ösztradiol arányának koncentrációfüggő csökkenése, a vegyi anyagok egyes koncentrációit tartalmazó ismétlések közötti csekély eltérés és a három vizsgálatmenet görbeillesztési paramétereinek következetessége jó indikátorai annak, hogy a vizsgálatot és az adatelemzést megfelelően hajtották végre. Egy adott vizsgálati vegyi anyag egyes vizsgálatmeneteiből származó eredmények értelmezése során szakmai megítélés alapján kell dönteni, és a vizsgálati vegyi anyagok kötődő vagy nem kötődő kategóriába sorolásához használt adatoknak tudományosan védhetőnek kell lenniük.

4. Időnként előfordulhatnak olyan adatok, amelyekre fokozottabb figyelmet kell fordítani ahhoz, hogy a humán ösztrogénreceptor-kötési adatokat megfelelően lehessen elemezni és értelmezni. Az előző tanulmányok során előálltak olyan helyzetek, amikor a kompetitív receptor kötési adatok elemzését és értelmezését megnehezítette a legmagasabb koncentrációban vizsgálati vegyi anyagok specifikus kötődési arányának megugrása (2. ábra). Ez egy jól ismert probléma, ami kompetitív receptor kötődési vizsgálatok protokolljának használatakor fordul elő (3). Ezekben az esetekben alacsonyabb koncentrációértékeknél koncentrációfüggő választ figyeltek meg, de amint a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja megközelíti az oldhatósági határértéket, a [^{3}H]-17β-ösztradiol leszorítása már nem csökken. Ilyenkor a magasabb koncentrációk eredménye azt jelzi, hogy elérték a vizsgálat biológiai hatásának határát. Ez a jelenség gyakran kapcsolódik a vizsgálati vegyi anyag magas koncentrációknál megnyilvánuló oldhatatlanságához vagy kicsapódásához, ugyanakkor jelentheti azt is, hogy a vegyi anyag legmagasabb koncentrációinál a dextránbevonatú aktívszén az elkülönítési folyamat során már nem képes megkötni a szabad radioaktívan jelölt ligandumokat. Ha ezek az adatpontok is részt vesznek a kompetitív kötési adatok szigmoid görbére illesztésében, az esetenként az adott vizsgálati vegyi anyag receptorkötési potenciáljának helytelen kategorizálásához vezethet (2. ábra). Ennek elkerülése érdekében a Freyberger–Wilson és a CERI ösztrogénreceptor-kötési vizsgálatának protokolljai biztosítják annak lehetőségét, hogy az elemzésből kizárják azokat az adatpontokat, amelyek esetében az ismétlések [3H]17β-ösztradiol specifikus kötődési arányának átlagértéke legalább 10 %-kal meghaladja a valamely alacsonyabb koncentrációnál megfigyelt átlagértéket (ez az úgynevezett 10 %-os szabály). Ezt a szabályt egy görbére egyszer lehet alkalmazni, és csak akkor, ha legalább 6 koncentráció adatai megmaradnak, hogy a görbe alapján megfelelő kategóriába lehessen sorolni a vizsgálati vegyi anyagot.

2. ábra

Példák a 10 %-os szabályt alkalmazó és nem alkalmazó kompetitív kötési görbékre

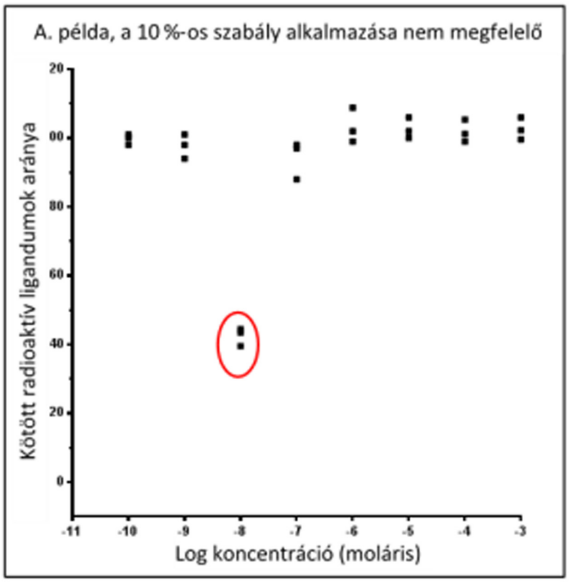


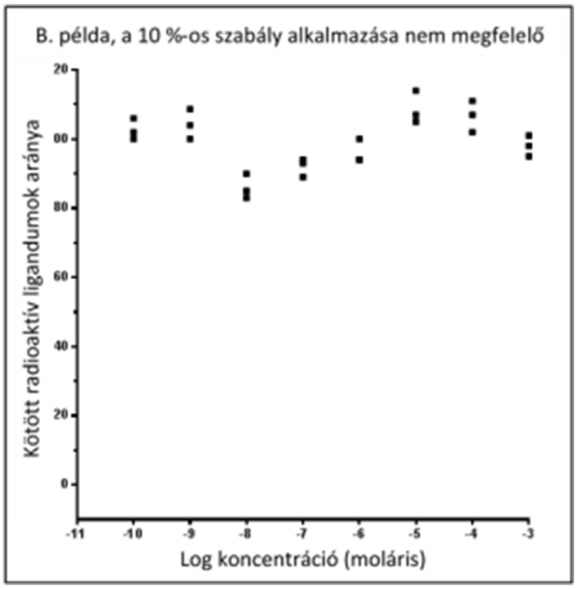
▼M8

5. A görbék korrigálására szolgáló 10 %-os szabály használatát alaposan mérlegelni kell, és csak azokban az esetekben szabad alkalmazni, amikor minden jel arra utal, hogy a receptorhoz kötődő anyagról van szó. A Freyberger–Wilson humán ösztrogénreceptor-kötési vizsgálat validálási tanulmányának keretében végzett kísérletek során megfigyelték, hogy a 10 %-os szabály alkalmazása esetenként nem szándékolt és előre nem látható következményekhez vezetett. Azok a vegyi anyagok, amelyek nem lépnek kölcsönhatásba a receptorral (vagyis a valódi nem kötődő anyagok) a radioaktív ligandumok közel 100 %-os kötésénél gyakran mutattak 10 %-nál nagyobb variabilitást a vizsgált koncentrációtartományban. Ha a legalacsonyabb értéket alacsony koncentráció idézi elő, a 10 %-os szabály alkalmazásakor előfordulhat, hogy az összes magasabb koncentráció adatait törölik az elemzésből, pedig e koncentrációk adatai hasznosak lennének a vegyi anyag nem kötődőként való azonosításához. A 3. ábra olyan helyzetekre hoz példát, ahol a 10 %-os szabály alkalmazása nem megfelelő.

3. ábra

Példák olyan kompetitív kötési adatokra, amelyek esetében a 10 %-os szabály alkalmazása nem megfelelő





▼**M8**

Hivatkozások

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

▼M8

B.71. **A BŐRSZENZIBILIZÁCIÓS KÁROS KIMENETI ÚT (AOP) EGYIK KULCSFONTOSSÁGÚ ESEMÉNYÉVEL, A DENDRITIKUS SEJTEK AKTIVÁCIÓJÁVAL FOGLALKOZÓ *IN VITRO* BŐRSZENZIBILIZÁCIÓS VIZSGÁLATOK**

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

A dendritikus sejtek aktivációján mint fő eseményen alapuló vizsgálati módszer

1. A bőrszenzibilizáló anyagok a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS) (1), valamint az Európai Unió (EU) anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendelete (CLP-rendelet) ([1]) szerint olyan anyagok, amelyek a bőrrel való érintkezést követően allergiás válaszreakciót váltanak ki. A bőrszenzibilizációt előidéző főbb biológiai eseményeket illetően általános egyetértés van. A bőrszenzibilizációhoz kapcsolódó kémiai és biológiai mechanizmusokról már rendelkezésre álló ismereteket az OECD AOP-programjának keretében kidolgozott káros kimeneti út (Adverse Outcome Pathway, AOP) (2) foglalja össze a molekuláris kiváltó eseménytől a köztes eseményeken át a káros hatásig, amely az allergiás kontakt bőrgyulladás. A bőrszenzibilizációs káros kimeneti út esetében a molekuláris kiváltó esemény (vagyis az első kulcsfontosságú esemény) az elektrofil anyagok és a bőrben lévő fehérjék nukleofil centrumai között létrejövő kovalens kötés. E káros kimeneti úton a második kulcsfontosságú esemény a keratinsejtekben következik be, többek között gyulladást okozó válaszreakciók, valamint konkrét sejtjelző útvonalakhoz, például az antioxidáns/elektrofil válaszelemtől (ARE) függő útvonalakhoz kapcsolódó génexpresszió-változások formájában. A harmadik kulcsfontosságú esemény a dendritikus sejtek (DC) aktivációja, melynek értékelése jellemzően konkrét sejtfelületi markerek, kemokinek és citokinek expressziója alapján történik. A negyedik kulcsfontosságú esemény a T-sejtek aktivációja és proliferációja, melynek közvetett értékelése az egereken alkalmazott lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer (LLNA) (3) keretében történik.

2. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 442E. vizsgálati iránymutatásában (2017) leírt módszerrel. A vizsgálati módszer a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út egyik kulcsfontosságú eseményének, a dendritikus sejtek aktivációjának mechanizmusaival foglalkozó in vitro vizsgálatokat ismerteti (2). Olyan vizsgálatokat foglal magában, amelyekkel elősegíthető a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok ENSZ-GHS és CLP-rendelet szerinti megkülönböztetése.

   A vizsgálati módszer az alábbi vizsgálatokat ismerteti:

   — emberi sejtvonal aktiválási vizsgálat (h-CLAT);

   — U937 sejtvonal aktiválási vizsgálat (U-SENS™);

   — Interleukin-8 riportergén vizsgálat (IL-8 Luc vizsgálat).

3. Az e vizsgálati módszer és az annak megfelelő OECD vizsgálati iránymutatás részét képező vizsgálatok adatgenerálási eljárásaik és a mért értékek tekintetében különbözhetnek egymástól, mindazonáltal megkülönböztetés nélkül használhatók arra, hogy eleget tegyenek a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út egyik kulcsfontosságú eseményének, a dendritikus sejtek aktivációjának vizsgálati eredményeire vonatkozó nemzeti követelményeknek, ugyanakkor előnyükre válik az adatok kölcsönös elfogadása az OECD-megállapodás szerint.

([1]) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról, HL L 353/1., 2008.12.31.

▼M8

A kulcsfontosságú eseményen alapuló vizsgálati módszer alá tartozó vizsgálatok háttere és elvei

4. A bőrszenzibilizáció vizsgálata jellemzően vizsgált állatokon történő vizsgálatot foglal magában. A tengerimalacokon alkalmazott klasszikus módszerek, vagyis a Magnusson–Kligman-féle tengerimalac-maximizációs vizsgálat (GPMT) és a Bühler-féle vizsgálat (B.6. vizsgálati módszer) (4) a bőrszenzibilizáció indukciós és kiváltási fázisával egyaránt foglalkozik. Az egereken alkalmazott vizsgálatok – a lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer (LLNA, B.42. vizsgálati módszer) (3) és két nem radioaktív változata, az LLNA: DA (B.50. vizsgálati módszer) (5) és az LLNA: BrdU-ELISA (B.51. vizsgálati módszer) (6) – mindegyike csak az indukciós válaszreakciót vizsgálja, és szintén elfogadottá váltak, mivel állatjólét szempontjából előnyösebbek, mint a tengerimalacon végzett vizsgálatok, és objektív mérést tesznek lehetővé a bőrszenzibilizáció indukciós fázisában.

5. Nemrégiben olyan mechanisztikus alapú in chemico és in vitro vizsgálati módszereket fogadtak el, amelyek a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út első kulcsfontosságú eseményével (B.59. vizsgálati módszer; közvetlen peptidreaktivitási vizsgálat (7)) és második kulcsfontosságú eseményével (B.60. vizsgálati módszer; ARE-Nrf2 luciferáz alapú vizsgálati módszer (8)) foglalkoznak, és hozzájárulnak a vegyi anyagok bőrszenzibilizációs veszélyességi potenciáljának értékeléséhez.

6. A vizsgálati módszerben ismertetett vizsgálatok mennyiségileg meghatározzák a monociták és a dendritikus sejtek szenzibilizáló anyagokkal való kezelést követően beinduló aktivációs folyamata által a sejtfelületi marker(ek) (pl. CD54, CD86) expressziójában előidézett változásokat, vagy a dendritikus sejtek aktivációja által egy citokin, az IL-8 expressziójában előidézett változásokat. A bőrszenzibilizáló anyagokról kimutatták, hogy a dendritikus sejtek aktivációjában részt vevő (2) sejtmembrán markerek (pl. CD40, CD54, CD80, CD83 és CD86), gyulladást okozó citokinek (pl. az interleukin-1 béta és a tumor nekrózis faktor alfa) és számos kemokin (pl. az IL-8 (CXCL8) és a CCL3) expresszióját (9) (10) (11) (12) idézik elő.

7. Mindazonáltal, mivel a dendritikus sejtek aktivációja csupán egyike a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út kulcsfontosságú eseményeinek (2) (13), a dendritikus sejtek aktivációjának markereit mérő vizsgálatokkal előállított információk önmagukban nem feltétlenül elegendőek ahhoz, hogy megállapítható legyen a vegyi anyagok bőrszenzibilizáló potenciálja van annak hiánya. Ezért az e vizsgálati módszerben leírt vizsgálatokkal kapott adatokat ajánlatos integrált vizsgálati és értékelési megközelítések keretében alkalmazni a bőrszenzibilizáló (ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategória) és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének támogatására olyan egyéb, releváns kiegészítő információkkal együtt, mint a bőrszenzibilizációs káros kimeneti út más kulcsfontosságú eseményeivel foglalkozó in vitro vizsgálatok eredményei, valamint a nem vizsgálatalapú módszerekkel, köztük a kémiai analógokból kereszthivatkozással kapott adatok (13). Közzétettek példákat az e vizsgálatokkal kapott adatok kidolgozott megközelítésekkel – vagyis az alkalmazott információforrások és az előrejelzéseket lehetővé tévő adatfeldolgozás tekintetében szabványosított megközelítésekkel – történő használatára (13), amelyek az integrált vizsgálati és értékelési megközelítések hasznos elemeként alkalmazhatók.

8. Az e vizsgálati módszerben leírt vizsgálatok nem alkalmazhatók önmagukban sem a bőrszenzibilizáló anyagoknak az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1A. és 1B. alkategóriába sorolására azon hatóságok által, amelyek alkalmazzák e két opcionális alkategóriát, sem a hatáserősség előrejelzésére a biztonsági értékeléssel kapcsolatos döntésekhez. A szabályozási kerettől függően azonban az e módszerekkel kapott pozitív eredmény önmagában is felhasználható a vegyi anyagok ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába sorolására.

▼M8

9. E vizsgálati módszer esetében a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezés a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra vonatkozik ([1]), és nem a vizsgálatok egy összetevőből álló anyagok, több összetevőből álló anyagok és/vagy keverékek vizsgálatára való alkalmazhatóságához kapcsolódik. Jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a vizsgálatok több összetevőből álló anyagokra és keverékekre való alkalmazhatóságával kapcsolatban (14) (15). Mindazonáltal a vizsgálatok technikailag alkalmazhatók több összetevőből álló anyagok és keverékek vizsgálatára. E vizsgálati módszer tervezett szabályozási célt szolgáló adatgenerálás érdekében, keveréken történő alkalmazása előtt azonban meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e erre a célra, és ha igen, miért ([2]). Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény. Ezenfelül a több összetevőből álló anyagok vagy keverékek vizsgálata során figyelembe kell venni a citotoxikus összetevőknek a megfigyelt válaszreakciókkal való lehetséges kölcsönhatását.

SZAKIRODALOM

(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. Elérhető a következő címen: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. Elérhető a következő címen:http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(201210/PART1&docLanguage=En).

(3) E melléklet B.42., Helyi nyirokcsomó-vizsgálat című fejezete.

(4) E melléklet B.6., Bőrszenzibilizáció című fejezete.

(5) E melléklet B.50., Bőrszenzibilizáció: helyi nyirokcsomó-vizsgálat: DA című fejezete.

(6) E melléklet B.51., Bőrszenzibilizáció: helyi nyirokcsomó-vizsgálat: BrdU-ELISA című fejezete.

(7) E melléklet B.59., In chemico bőrszenzibilizáció: közvetlen peptid reaktivitás vizsgálat (DPRA) című fejezete.

(8) E melléklet B.60., *In Vitro* bőrszenzibilizáció: ARE-Nrf2 luciferáz alapú vizsgálati módszer című fejezete.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

([1]) 2013 júniusában az OECD együttes ülése megállapodott abban, hogy ahol csak lehetséges, az OECD új és átdolgozott vizsgálati iránymutatásaiban következetesebben alkalmazzák a „vizsgálati vegyi anyag” kifejezést a vizsgálat tárgyát képező vegyi anyagra.

([2]) Ezt a mondatot a WNT 2014. áprilisi ülése javasolta és hagyta jóvá.

▼**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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen:https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

▼M8

1. függelék

IN VITRO BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: EMBERI SEJTVONAL AKTIVÁLÁSI VIZSGÁLAT (H-CLAT)

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

1. A h-CLAT mennyiségileg meghatározza a THP-1 humán monocita leukémia sejtvonal monocitáinak és dendritikus sejtjeinek a szenzibilizáló anyagokkal való kezelést követően beinduló aktivációs folyamata által a sejtfelületi marker(ek) (CD86 és CD54) expressziójában előidézett változásokat (1) (2). Ezt követően a CD86 és a CD54 sejtfelületi marker mért expressziós szintjét a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására használják fel.

2. A h-CLAT-ot az Állatkísérletek Alternatíváinak Uniós Referencialaboratóriuma (EURL ECVAM) által koordinált validálási vizsgálatban értékelték, az EURL ECVAM tudományos tanácsadó bizottsága (ESAC) pedig független szakértői értékelésnek vetette alá. A rendelkezésre álló bizonyítékok, valamint a szabályozó hatóságok és az érdekeltek álláspontja alapján az EURL ECVAM a h-CLAT-ot integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő alkalmazásra ajánlotta (3) a veszélyességi osztályozás és címkézés céljából a bőrszenzibilizáló és nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására. A h-CLAT-ból származó adatok és más információk együttes használatára fellelhetők példák a szakirodalomban (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

3. A h-CLAT-ról bebizonyosodott, hogy áthelyezhető a sejttenyésztési technikák és az áramlási citometriás elemzés terén tapasztalattal rendelkező laboratóriumokba. A vizsgálattól várható előrejelzések reprodukálhatóságának mértéke a laboratóriumokon belül és között mintegy 80 % (3) (12). A validálási vizsgálatban (13) és más közzétett tanulmányokban (14) kapott eredmények összességében azt jelzik, hogy a hCLAT a bőrszenzibilizáló (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) anyagokat az LLNA vizsgálati módszer eredményeihez képest 85 %-os (N=142) pontossággal különbözteti meg a nem szenzibilizáló anyagoktól, 93 % az érzékenysége (94/101), a specifikussága pedig 66 % (27/41) (az EURL ECVAM által végzett ismételt elemzés alapján (12), amely figyelembe vette az összes rendelkezésre álló adatot, ugyanakkor a 4. pontban leírtak szerint figyelmen kívül hagyta a 3,5-nél nagyobb Log Kow értékkel rendelkező vegyi anyagok negatív eredményét). A h-CLAT nagyobb valószínűséggel vezet hamis negatív előrejelzésekhez olyan vegyi anyagoknál, amelyeknek alacsonytól mérsékeltig terjedő a szenzibilizáló hatása (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1B. alkategóriába tartozó anyagoknál), mint a rendkívül bőrszenzibilizáló hatást mutató vegyi anyagoknál (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1A. alkategóriába tartozó anyagoknál) (4) (13) (15). Ezek az információk összességében azt jelzik, hogy a h-CLAT módszer érdemben hozzájárul a bőrszenzibilizáció veszélyeinek azonosításához. A h-CLAT mint önálló vizsgálat esetében itt megadott pontossági értékek azonban csak irányadóak, ugyanis a vizsgálatot az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében más információforrásokkal együtt és az Általános bevezetés 7. és 8. pontjának rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni. Ezen túlmenően a bőrszenzibilizáció nem állatokon alkalmazott módszereinek értékelésekor nem szabad megfeledkezni arról, hogy az LLNA vizsgálat, valamint más állatkísérletek nem feltétlenül tükrözik teljes egészében az embernél fennálló helyzetet.

4. Az aktuálisan rendelkezésre álló adatok alapján a h-CLAT módszerről bebizonyosodott, hogy különféle szerves funkciós csoportokat, reakciómechanizmusokat, (in vivo vizsgálatok során meghatározott) bőrszenzibilizáló hatásokat és fizikai-kémiai tulajdonságokat képviselő vizsgálati vegyi anyagokra alkalmazható (3) (14) (15). A h-CLAT módszer olyan vizsgálati vegyi anyagokra alkalmazandó, amelyek megfelelő oldószerben/vivőanyagban (lásd a 14. pontot) oldhatók, vagy azokkal stabil diszperziót alkotnak (azaz olyan kolloidot vagy szuszpenziót, amelyben a vizsgálati vegyi anyag nem ülepedik le, illetve nem válik szét az oldószertől/vivőanyagtól különböző fázisokra). A 3,5-nél magasabb log Kow értékkel rendelkező vizsgálati vegyi anyagok általában hamis negatív eredményre vezetnek (14). Ezért a 3,5-nél magasabb log Kow értékkel rendelkező vizsgálati vegyi anyagok negatív eredményét figyelmen kívül kell hagyni. Ugyanakkor a 3,5-nél

▼M8

magasabb log Kow értékkel rendelkező vizsgálati vegyi anyagok pozitív eredménye még felhasználható a vizsgálati vegyi anyag bőrszenzibilizáló anyagként való azonosításának alátámasztására. Ezen túlmenően az alkalmazott sejtvonal korlátozott metabolikus képessége (16) és a kísérleti körülmények miatt különösen a pro-haptének (azaz például a P450 enzim közreműködésével enzimatikus aktivációt igénylő anyagok) és a lassú oxidációs rátájú pre-haptének (azaz az oxidációval aktiválódó anyagok) is negatív eredményre vezethetnek a h-CLAT vizsgálatban (15). A h-CLAT vizsgálat alkalmas fluoreszcens vizsgálati vegyi anyagok értékelésére (17); mindazonáltal azok az erősen fluoreszcens vizsgálati vegyi anyagok, amelyek a fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC), illetve a propídium-jodiddal (PI) azonos hullámhosszon bocsátják ki a fényt, zavarják az áramlási citometriás észlelést, ezért FITC-vel összekapcsolt ellenanyagok, illetve propídium-jodid használatával nem értékelhetők megfelelően. Ilyen esetben használhatók más fluorokrómmal jelzett ellenanyagok vagy más citotoxikus markerek, ha például az 1.2. függelékben szereplő jártassági tesztanyagok vizsgálata révén bizonyítást nyer, hogy a FITC-vel jelzett ellenanyagokhoz (lásd a 24. pontot) vagy a propídium-jodidhoz (lásd a 18. pontot) hasonló eredményt biztosítanak. A fentiek fényében: a negatív eredményeket a közölt korlátokra tekintettel és az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretébe tartozó egyéb információforrásokkal együtt kell értelmezni. Olyan esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy a h-CLAT módszer nem alkalmazható más, konkrét vegyianyag-kategóriákra, a módszert nem szabad e vegyianyag-kategóriákra alkalmazni.

5. A fentieknek megfelelően a h-CLAT módszer elősegíti a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetését. Hozzájárulhat azonban a szenzibilizáló hatás erősségének értékeléséhez is (4) (5) (9), ha az integrált vizsgálati és értékelési megközelítéshez hasonló integrált megközelítések keretében alkalmazzák. Lehetőleg humán adatokon alapuló további munkára van azonban szükség annak meghatározásához, hogy a h-CLAT eredményei hogyan járulhatnak hozzá a hatáserősség vizsgálatához.

6. A fogalommeghatározások az 1.1. függelékben találhatók.

A VIZSGÁLAT ELVE

7. A h-CLAT módszer egy in vitro vizsgálat, amely mennyiségileg meghatározza a THP-1 humán monocita leukémia sejtvonal sejtjein kifejeződő sejtfelületi markerek (CD86 és CD54) expressziójában a vizsgálati vegyi anyaggal való 24 órás kezelés révén bekövetkező változásokat. Ezek a sejtfelszíni molekulák a monocita THP-1 aktiváció jellegzetes markerei, és képesek imitálni a dendritikus sejtek aktivációját, ami kulcsszerepet játszik a T-sejtek aktiválásában. A sejtfelületi markerek expressziójának változásait áramlási citometriával mérik, miután a sejteket megfestették fluorokrómmal jelzett ellenanyagokkal. Ezzel egyidejűleg citotoxicitási méréseket is végeznek annak felméréséhez, hogy a citotoxikus koncentrációknál alacsonyabb koncentráció mellett fokozódik-e a felületi markerek expressziója. Meghatározzák a felületi markerek oldószeres/vivőanyagos kontrollhoz viszonyított relatív fluoreszcencia-intenzitását, amelyet az előrejelzési modellben (lásd a 26. pontot) felhasználnak a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására.

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

8. A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak az 1.2. függelékben felsorolt tíz jártassági tesztanyag felhasználásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat. Ezenfelül a vizsgálat felhasználóinak történeti adatbázist kell fenntartaniuk, amely tartalmazza a reaktivitási tesztekből (lásd a 11. pontot), valamint a pozitív és az oldószeres/vivőanyagos kontrollokból (lásd a 20–22.pontot) származó adatokat, ezekkel az adatokkal igazolva a vizsgálat laboratóriumon belüli hosszú távú reprodukálhatóságát.

▼M8

ELJÁRÁS

9. Ez a vizsgálat az állatkísérletek alternatív módszereire vonatkozó adatbázis-szolgáltatás (DB-ALM) h-CLAT-ot érintő 158. protokollján (18) alapul, amely az EURL ECVAM által koordinált validálási vizsgálathoz használt protokoll. A h-CLAT módszer laboratóriumi végrehajtása és alkalmazása során e protokoll alkalmazása ajánlott. Az alábbiakban a h-CLAT módszer főbb összetevőinek és eljárásainak leírása található; a módszer a következő két lépésből áll: *dózisbehatároló vizsgálat* és *CD86/CD54 expresszió mérése*.

Sejtek előkészítése

10. A h-CLAT módszer végrehajtásához a THP-1 humán monocita leukémia sejtvonalat kell használni. Ajánlatos a (TIB-202™) sejteket egy megfelelő minősítéssel rendelkező sejtbankból, például az Amerikai Fajtakultúra Gyűjteményből beszerezni.

11. A THP-1 sejteket 10 % magzati borjú szérummal (FBS), 0,05 mM 2-merkaptoetanollal, 100 egység/ml penicillinnel és 100 μg/ml sztreptomicinnel kiegészített RPMI-1640 tápoldatban, valamint 37°C-os, 5 %-os CO_2-tartalmú és vízgőzzel telített környezetben kell tenyészteni. A tápfolyadékból a penicillin és a sztreptomicin elhagyható. Ez esetben azonban a felhasználóknak például az 1.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok tesztelésével meg kell bizonyosodniuk arról, hogy az antibiotikumok hiánya a tápfolyadékban nem befolyásolja az eredményt. A fertőzés kockázatának minimalizálása érdekében minden esetben a megfelelő sejttenyésztési gyakorlatok szerint kell eljárni, függetlenül attól, hogy van-e antibiotikum a sejttenyésztő tápfolyadékban. A THP-1 sejteket 2–3 naponta 0,1–0.2 × 10^6 sejt/ml sűrűségben rutinszerűen leoltják. A sejtek fenntartása során meg kell őrizni a 0,1–1,0 × 10^6 sejt/ml sejtsűrűséget. A vizsgálatban való felhasználásuk előtt a sejteket egy reaktivitási teszt során minősíteni kell. A sejtek reaktivitási tesztjét a felolvasztásuk után két héttel kell elvégezni, a pozitív kontroll-anyagokkal, vagyis a 2,4-dinitro-klór-benzollal (DNCB) (CAS-száma: 97-00-7, legalább 99 %-os tisztaságban) és a nikkel-szulfáttal ($NiSO_4$) (CAS-száma: 10101-97-0, legalább 99 %-os tisztaságban), valamint a negatív kontrollanyaggal, a tejsavval (LA) (CAS-száma: 50-21-5, legalább 85 % tisztaságban). Mind a DNCB-nak, mind a $NiSO_4$-nak pozitív választ, a tejsavnak pedig negatív választ kell kiváltania a CD86 és a CD54 sejtfelületi markernél egyaránt. A vizsgálathoz kizárólag a reaktivitási tesztben megfelelt sejtek használhatók. A sejtek a felolvasztásukat követően két hónapig szaporíthatók. A sejteket legfeljebb 30 alkalommal szabad passzálni. A reaktivitási tesztet a 20–24. pontban leírt eljárások szerint kell végrehajtani.

12. A vizsgálathoz a THP-1 sejteket vagy 0,1 × 10^6 sejt/ml vagy 0,2 × 10^6 sejt/ml sűrűségben átoltják, majd sejttenyésztő lombikban az előbbi esetben 72 óráig, az utóbbiban pedig 48 óráig előtenyésztik. Fontos, hogy közvetlenül az előtenyésztési időszak végét követően a sejttenyésztő lombikban minden (a fenti két előtenyésztési körülmény egyikét alkalmazó) kísérletben a sejtek sűrűsége nagyjából azonos legyen, mert közvetlenül az előtenyésztési időszak végét követően a sejttenyésztő lombikban fennálló sejtsűrűség befolyásolhatja az allergének által kiváltott CD86/CD54 expressziót (19). A vizsgálat napján a sejttenyésztő lombikból begyűjtött sejteket frissen készített tápfolyadékban 2 × 10^6 sejt/ml sűrűségben újraszuszpendálják. Ezt követően a sejteket elhelyezik egy 24 lyukú, lapos fenekű lemezben (500 μl, lyukanként 1 × 10^6 sejt) vagy egy 96 lyukú, lapos fenekű lemezben (80 μl, lyukanként 1,6 × 10^5 sejt).

Dózisbehatároló vizsgálat

13. A *dózisbehatároló vizsgálat* során meghatározzák a CV75 értéket, azaz a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációját, amely az oldószeres/vivőanyagos kontrollhoz képest 75 %-os sejtéletképességet (CV) idéz elő. A CV75 értéket arra használják, hogy meghatározzák a vizsgálati vegyi anyagok koncentrációját a *CD86/CD54* expresszió méréséhez (lásd a 20–24. pontot).

▼M8

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok előkészítése

14. A vizsgálati vegyi anyagokat és a kontrollanyagokat a vizsgálat napján kell előkészíteni. A h-CLAT módszerben a vizsgálati vegyi anyagokat feloldják vagy stabilan diszpergálják (lásd még a 4. pontot) sóoldatban vagy tápoldatban, mint az első számú oldószer/vivőanyag választás, vagy dimetil-szulfoxidban (DMSO, legalább 99 %-os tisztaságban), mint második oldószer/vivőanyag választás, ha a vizsgálati vegyi anyag az előző két oldószerben/vivőanyagban nem oldható vagy nem diszpergálható stabilan, a végső koncentráció 100 mg/ml (sóoldat vagy tápoldat használata esetén) vagy 500 mg/ml (DMSO használata esetén). A fentiektől eltérő oldószerek/vivőanyagok megfelelő tudományos indokolással szintén használhatók. Figyelembe kell venni azt is, hogy a vizsgálati vegyi anyag mennyire stabil a végső oldószerben/vivőanyagban.

15. A vizsgálati vegyi anyagok 100 mg/ml (sóoldat vagy tápoldat használata esetén) vagy 500 mg/ml (DMSO használata esetén) törzsoldatából kiindulva az alábbi hígítási lépéseket kell elvégezni:

— Ha az oldószer/vivőanyag sóoldat vagy tápoldat: A megfelelő oldószer/vivőanyag használatával nyolc törzsoldatot (nyolc koncentrációt) készítenek, kétszeres oldatsorozatban. E törzsoldatokat ezután a tápfolyadékban 50-szeresükre tovább kell hígítani (munkaoldatok). Amennyiben a lemezre helyezett legnagyobb, 1 000 μg/ml-es végső koncentráció nem toxikus, a legmagasabb koncentrációértéket egy új citotoxicitási vizsgálatban újból meg kell határozni. A sóoldatban vagy tápoldatban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyagok lemezre helyezett végső koncentrációja nem haladhatja meg az 5 000 μg/ml értéket.

— Ha az oldószer/vivőanyag DMSO: A megfelelő oldószer/vivőanyag használatával nyolc törzsoldatot (nyolc koncentrációt) készítenek, kétszeres oldatsorozatban. E törzsoldatokat ezután a tápfolyadékban 250-szeresükre tovább kell hígítani (munkaoldatok). A lemezre helyezett végső koncentráció még akkor sem haladhatja meg az 1 000 μg/ml értéket, ha ez a koncentráció nem toxikus.

Végül pedig felhasználják a munkaoldatokat a kezeléshez, ehhez a kétszeres továbbhígítás érdekében azonos mennyiségű munkaoldatot adnak hozzá a lemezen lévő THP-1 sejtszuszpenzióhoz (lásd a 17. pontot), a lemez végleges koncentrációértékei általában 7,81–1 000 μg/ml tartományban helyezkednek el.

16. A h-CLAT módszerben alkalmazott oldószeres/vivőanyagos kontroll a tápfolyadék (a tápfolyadékban vagy sóoldatban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyagok esetében (lásd a 4. pontot)) vagy a DMSO (a DMSO-ban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyagok esetében), amelyet egyetlen végső, 0,2 %-os koncentrációban vizsgálnak a lemezen. Az oldószeres/vivőanyagos kontrollt a munkaoldatokhoz alkalmazott eljárás szerint kell hígítani (lásd a 15. pontot).

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok alkalmazása

17. A 15. és a 16. pontban leírt módon elkészített tápfolyadékot vagy munkaoldatokat 1: 1 térfogatszázalék arányban össze kell keverni a 24 lyukú vagy 96 lyukú lapos fenekű lemezen elkészített sejtszuszpenziókkal (lásd a 12. pontot). A kezelt lemezeket ezt követően 24 óráig (±0,5 óra) 37°C-on 5 % CO_2 jelenlétében inkubálják. Ügyelni kell az illékony vizsgálati vegyi anyagok elpárolgásának elkerülésére, valamint a lyukak vizsgálati vegyi anyagokkal való keresztszennyeződésének elkerülésére, például a lemezek befedhetők fóliával a vizsgálati vegyi anyagokkal való inkubálás előtt (20).

▼**M8**

Festés propídium-jodiddal

18. A 24 órás (±fél óra) kezelést követően a sejteket mintacsövekbe helyezik át és centrifugálással kinyerik őket. A felülúszót eltávolítják, a maradék sejtet pedig 0,1 % borjú szérum albuminnal kiegészített 200 µl (96 lyukú lemez esetén) vagy 600 µl (24 lyukú lemez esetén) foszfátpuffert tartalmazó sóoldattal (festő puffer) újraszuszpendálják. 200 µl sejtszuszpenziót áthelyeznek egy 96 lyukú, gömbölyű fenekű lemezre (96 lyukú lemez használata esetén) vagy mikrocsőbe (24 lyukú lemez használata esetén), majd két alkalommal átmossák 200 µl (96 lyukú lemez használata esetén) vagy 600 µl (24 lyukú lemez használata esetén) festő pufferrel. Végül a sejteket (pl. 400 µl) festő pufferben újraszuszpendálják, és hozzáadnak (pl. 20 µl) propídium-jodidot (a propídium-jodid végső koncentrációja lehet például 0,625 µg/ml). Más citotoxicitási markerek, például 7-amino-aktinomicin D (7-AAD), tripankék vagy egyéb markerek is alkalmazhatók, amennyiben az alternatívaként használt festékről például az 1.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok tesztelésével kimutatták, hogy a propídium-jodidhoz hasonló eredményekre vezet.

Citotoxicitás mérése áramlási citometriával és a CV75 érték megbecslésével

19. A propídium-jodid (PI) felvételét áramlási citometriával elemzik az FL-3 adatgyűjtő csatornán. Összesen 10 000 élő (PI negatív) sejt adatait gyűjtik össze. A sejtéletképességet az alábbi egyenlet alapján kalkulálja ki a citométer elemzőprogramja. Alacsony sejtéletképességnél az elhalt sejtekkel együtt legfeljebb 30 000 sejt adatait gyűjtik össze. Ennek alternatívája lehet az, amikor az adatokat az elemzés elindításától számítva egy percen át gyűjtik.

$$Sejtéletképesség = \frac{élő\ sejtek\ száma}{összegyűjtött\ sejtek\ száma\ összesen} \times 100$$

A CV75 értéket (lásd a 13. pontot), vagyis azt a koncentrációt, amelynél a THP-1 sejtek túlélési aránya 75 % (a toxicitás 25 %), logaritmikus-lineáris interpolációval számítják ki, az alábbi egyenlet alapján:

$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

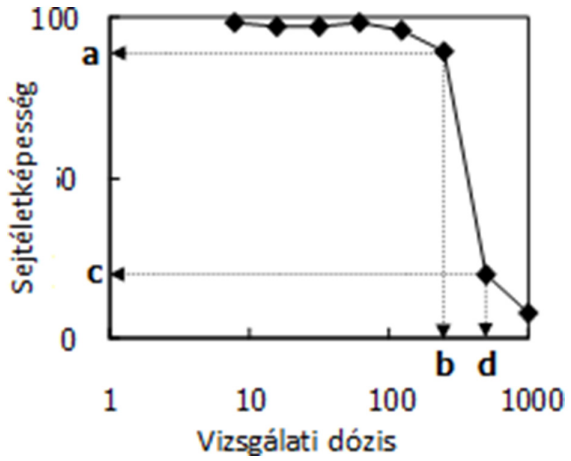
ahol:

a = a 75 % feletti sejtéletképesség minimumértéke

c = a 75 % alatti sejtéletképesség maximumértéke

b és d = az a és c sejtéletképességet előidéző koncentrációk

▼**M8**



A CV75 érték más módon is meghatározható, amennyiben (pl. a jártassági tesztanyagok tesztelésével) igazolható, hogy az nem befolyásolja az eredményt.

CD86/CD54 expresszió mérése

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok előkészítése

20. A vizsgálati vegyi anyagokat feloldják vagy stabilan diszpergálják a megfelelő oldószerben/vivőanyagban (sóoldat, tápoldat vagy DMSO; lásd a 14. pontot). A vizsgálati vegyi anyagokat elsőként a *dózisbehatároló vizsgálatban* (lásd a 19. pontot) meghatározott CV75 érték 1,2-szerese 100-szorosának (sóoldat vagy tápoldat esetén) vagy 500-szorosának (DMSO esetén) megfelelő koncentrációra hígítják. Amennyiben a CV75 érték nem határozható meg (ha a *dózisbehatároló vizsgálatban* nem figyeltek meg kellő mértékű citotoxicitást), az induló koncentrációérték a vizsgálati vegyi anyag egyes oldószerekkel/vivőanyagokkal készített legmagasabb oldható vagy stabilan diszpergált koncentrációja legyen. A lemezre helyezett végső koncentráció azonban nem haladhatja meg az 5 000 μg/ml értéket (sóoldat vagy tápoldat esetén), illetve az 1 000 μg/ml értéket (DMSO esetén). Ezt követően a megfelelő oldószer/vivőanyag használatával 1,2-szeres oldatsorozatot készítenek (nyolc koncentrációval 100×1,2 × CV75 és 100×0,335 × CV75 között (sóoldat vagy tápoldat esetén), illetve 500×1,2 × CV75 és 500×0,335 × CV75 között (DMSO esetén)), létrehozva ezzel a h-CLAT módszerrel vizsgálandó törzsoldatokat (egy adagolási minta megtalálható a DB-ALM 158. protokolljában). A törzsoldatokat ezután a tápfolyadékban 50-szeresükre (sóoldat vagy tápfolyadék esetén), illetve 250-szeresükre (DMSO esetén) továbbhígítják (elkészítve a munkaoldatokat). Ezeket a munkaoldatokat végül felhasználják a kezeléshez, ehhez kétszeres hígítási tényező alkalmazásával elkészítik a lemezre helyezett végső oldatokat. Amennyiben az eredmények nem teljesítik a 29. és a 30. pontban szereplő sejtéletképességi kritériumokat, a CV75 értékének pontosabb meghatározása érdekében a *dózisbehatároló vizsgálat* megismételhető. A CD86/CD54 expresszió mérésére csak 24 lyukú lemezek használhatók.

21. Az oldószeres/vivőanyagos kontrollt a 16. pontban leírtak szerint kell elkészíteni. A h-CLAT módszerben alkalmazott pozitív kontrollanyag a DNCB (lásd a 11. pontot), amelynek törzsoldatait DMSO-ban készítik el, a törzsoldatokat pedig a 20. pontban foglaltak szerint hígítják. A *CD86/CD54 expresszió mérése* során pozitív kontrollanyagként használt DNCB-t egyetlen végső (általában 4,0 μg/ml) koncentrációban vizsgálják a lemezen. Ahhoz,

▼M8

hogy 4,0 μg/ml koncentrációjú DNCB kerüljön a lemezre, DMSO-ban elkészítik a DNCB 2 mg/ml koncentrációjú törzsoldatát, majd a törzsoldatot tápfolyadékban a 250-szeresére hígítva elkészítik a 8 μg/ml koncentrációjú munkaoldatot. A pozitív kontrollanyag koncentrációjaként használható a DNCB CV75 értéke, amelyet minden vizsgálólaboratóriumban meghatároznak. Alkalmazhatók más, megfelelő pozitív kontrollok is, ha rendelkezésre állnak dokumentált adatok hasonló vizsgálatmenet-elfogadhatósági kritériumok származtatásához. A pozitív kontrollanyag egyetlen végső koncentrációban kerül a lemezre, amely nem haladhatja meg az 5 000 μg/ml értéket (sóoldat vagy tápoldat esetén), illetve az 1 000 μg/ml értéket (DMSO esetén). A vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumai megegyeznek a vizsgálati vegyi anyag elfogadhatósági kritériumaival (lásd a 29. pontot), az utolsó kritériumot leszámítva, mivel a pozitív kontrollanyagot egyetlen koncentrációban vizsgálják.

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok alkalmazása

22. Minden vizsgálati vegyi anyag és kontrollanyag esetében egy kísérletre van szükség az előrejelzéshez. Valamennyi kísérlet legalább két független *CD86/CD54 expresszió mérési* vizsgálatmenetből áll (lásd a 26–28. pontot). Mindegyik független vizsgálatmenetet más-más napon kell elvégezni, illetve a vizsgálatmenetek ugyanazon a napon is elvégezhetők, ha minden vizsgálatmenethez: a) a vizsgálati vegyi anyag és az ellenanyag oldatok egymástól független, frissen készített törzsoldatait és munkaoldatait használják és b) egymástól függetlenül begyűjtött sejteket (vagyis különböző sejttenyésztő lombikból gyűjtött sejteket) használnak; a sejtek azonban származhatnak ugyanabból a passzálásból. A vizsgálati vegyi anyagok és kontrollanyagok elkészített munkaoldatait (500 μl) 1: 1 arányban összekeverik 500 μl szuszpendált (1 x 10^6) sejttel, majd a sejteket a 20. és 21. pontban leírtak szerint 24 óráig (± fél óra) inkubálják. Minden vizsgálatmenetben elegendő a vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyag egyes koncentrációit egy replikátumban mérni, mivel az előrejelzést legalább két független vizsgálatmenet alapján határozzák meg.

Sejtek festése és adatok elemzés

23. A 24 órás (± fél óra) kezelést követően a sejteket a 24 lyukú lemezről mintacsövekbe helyezik, centrifugálással begyűjtik, majd 1 ml festő pufferben kétszer átmossák (szükség esetén be lehet iktatni további mosási lépéseket). A mosást követően a sejtek növekedését meggátolják 600 μl blokkoló oldattal (festő puffer 0,01 tömegszázalékos globulinnal (II-es, III-as Cohn-frakció, humán eredetű; SIGMA, #G2388-10G vagy azzal egyenértékű)), majd a sejteket 4°C-on 15 percre inkubálják. A blokkolást követően a sejteket három egyenlő 180 μl mennyiségű részre osztva 96 lyukú gömbölyű fenekű lemezbe vagy mikrocsőbe helyezik.

24. A centrifugálást követően a sejteket 4°C-on 30 percen át festik 50 μl FITC-vel jelzett anti-CD86, anti-CD54 vagy egér IgG1 (izotípus) ellenanyagokkal. A h-CLAT-ra vonatkozó 158. sz. DB-ALM protokollban (18) leírt ellenanyagokat kell alkalmazni festő pufferrel való 3: 25 térfogatszázalékos hígításban a CD86 esetében (BD-PharMingen, #555657; Fun-1 klón), illetve 3: 50 térfogatszázalékos hígításban a CD54 esetében (DAKO, #F7143; 6.5B5 klón) és az IgG1 esetében (DAKO, #X0927). Az ellenanyagok hígítási tényezőjét a vizsgálat kidolgozói határozták meg az alapján, hogy ezek biztosították a legjobb jel-zaj arányt. A vizsgálat kidolgozói által szerzett tapasztalatok arra utalnak, hogy az ellenanyagok fluoreszcencia-intenzitása a különböző tételeknél általában konzisztens. A legmegfelelőbb vizsgálati koncentrációértékek meghatározásához azonban a felhasználók fontolóra vehetik az ellenanyagok saját laboratóriumi körülményeik mellett történő titrálását. Más fluorokrómmal jelzett anti-CD86 és/vagy anti-CD54 ellenanyagok is alkalmazhatók, amennyiben például az 1.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok tesztelésével kimutatták, hogy a FITC-vel összekapcsolt ellenanyagokhoz hasonló eredményekre vezetnek. Megjegyzendő, hogy a h-CLAT-ra vonatkozó 158. sz. DB-ALM protokollban (18) leírt ellenanyag

▼M8

klón vagy forgalmazó lecserélése befolyással lehet az eredményekre. Miután legalább kétszer átmosták 150 µl festék pufferrel, a sejteket (pl. 400 µl) festék pufferben újraszuszpendálják, és hozzáadják a PI oldatot (pl. 20 µl mennyiségben, amellyel elérhető a végső 0,625 µg/ml koncentráció) vagy egy másik citotoxicitási marker oldatát (lásd a 18. pontot). A CD86 és a CD54 expressziójának mértékét és a sejtéletképességet áramlási citometriával elemzik.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az adatok kiértékelése

25. A CD86 és a CD54 kifejeződését áramlási citometriával elemzik az FL-1 adatgyűjtő csatornán. A pozitív kontrollként szolgáló sejtek és a vegyi anyaggal kezelt sejtek CD86 és CD54 relatív fluoreszcencia-intenzitását (RFI) a fluoreszcencia-intenzitás mértani középértéke (MFI) alapján és az alábbi egyenlet szerint számítják ki:

$$RFI = \frac{\textit{Vegyi anyaggal kezelt sejtek MFI - je -}}{\textit{vegyi anyaggal kezelt izotípusos kontrollsejtek MFI - je}} \times 100$$
$$\textit{oldósz./vivőanyaggal kez. kontr.sejtek MFI - je -}$$
$$\textit{oldósz./vivőanyaggal kez./izotíp.kontr.sejtek MFI - je}$$

Az izotípusos kontrollként szolgáló sejtek életképességét (amelyeket egér IgG1 (izotípus) ellenanyagokkal festettek meg) szintén a 19. pontban feltüntetett egyenlettel határozzák meg.

Előrejelzési modell

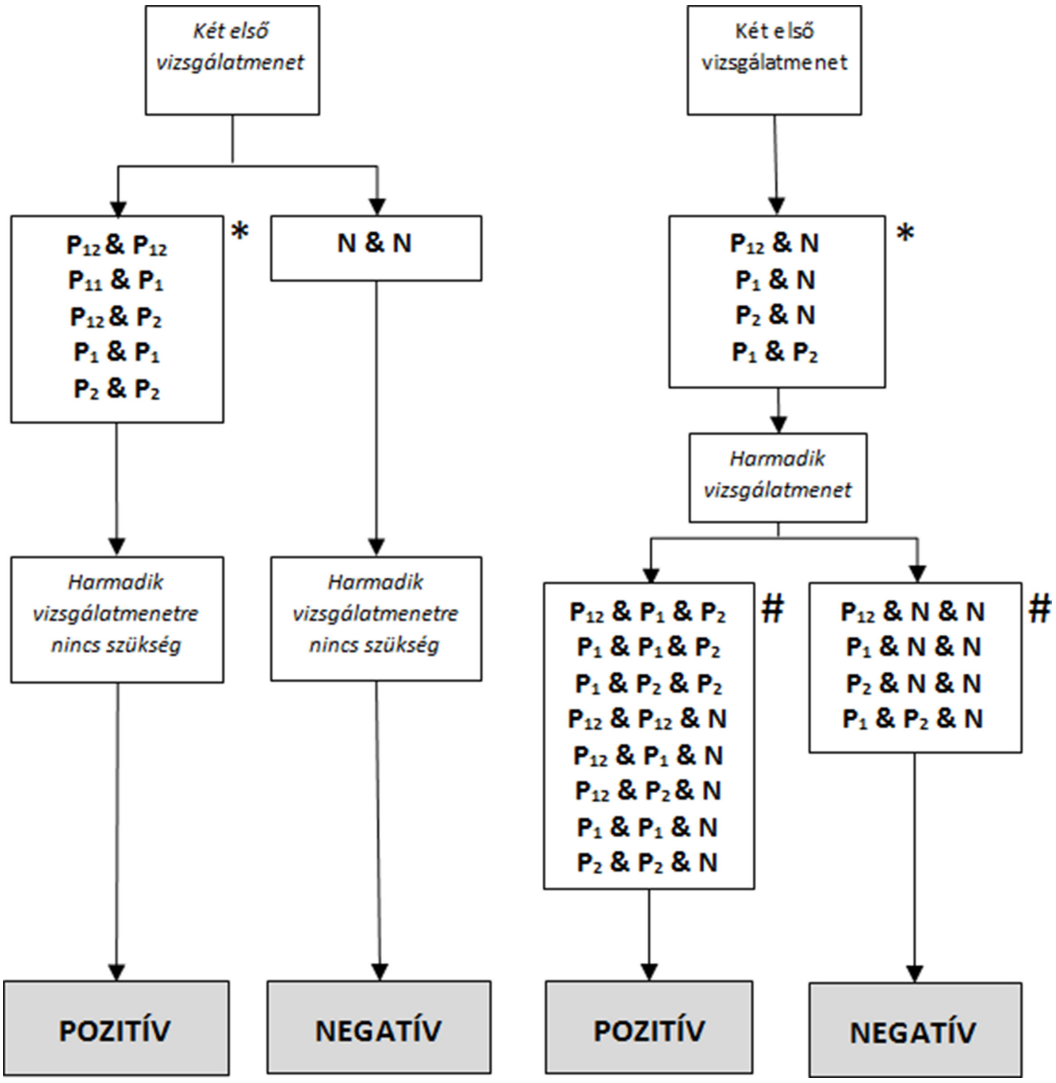
26. A *CD86/CD54* expressziós mérésnél minden vizsgálati vegyi anyagot legalább két független vizsgálatmenetben tesztelnek, amelyek alapján meghatározzák a (POZITÍV vagy NEGATÍV) előrejelzést. A h-CLAT előrejelzés akkor minősül POZITÍVNAK, ha két független vizsgálatmenetből kettőben vagy három független vizsgálatmenetből legalább kettőben az alábbi feltételek legalább egyike teljesül, minden egyéb esetben a h-CLAT előrejelzés negatívnak minősül (1. ábra):

— a CD86 relatív fluoreszcencia-intenzitása bármely vizsgált koncentrációban legalább 150 % (legalább 50 %-os sejtéletképesség mellett);

— a CD54 relatív fluoreszcencia-intenzitása bármely vizsgált koncentrációban legalább 200 % (legalább 50 %-os sejtéletképesség mellett).

27. A fentiek alapján, ha az első két vizsgálatmenet pozitív eredménnyel zárult a CD86 és/vagy a CD54 esetében, akkor a h-CLAT vizsgálat előrejelzése POZITÍVNAK tekintendő, és harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség. Hasonlóképpen, ha az első két vizsgálatmenet mindkét marker tekintetében negatív, akkor a h-CLAT előrejelzése NEGATÍVNAK minősül (figyelembe véve a 30. pontban foglaltakat), és harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség. Ha azonban az első két vizsgálatmenet eredményei legalább az egyik marker (CD54 vagy CD86) esetében nem egyeznek, el kell végezni egy harmadik vizsgálatmenetet, és a végső előrejelzés a három független vizsgálatmenet többségi eredményén (a háromból kettőjén) fog alapulni. Ezzel kapcsolatban megjegyzendő, hogy ha két független vizsgálatmenetben az egyik csak a CD86 tekintetében pozitív (a továbbiakban P_1) és a másik csak a CD54 esetében pozitív (a továbbiakban P_2), harmadik vizsgálatmenetre van szükség. Amennyiben a harmadik vizsgálatmenet mindkét marker esetében negatív eredménnyel jár (a továbbiakban N), akkor a h-CLAT vizsgálat előrejelzése NEGATÍVNAK tekintendő. Másfelől viszont, ha a harmadik vizsgálatmenet bármelyik marker (P_1 vagy P_2) esetében vagy mindkét marker (a továbbiakban P_{12}) esetében pozitív eredménnyel zárul, a h-CLAT vizsgálat előrejelzése POZITÍVNAK tekintendő.

▼**M8**



1. ábra: A h-CLAT módszerben alkalmazott előrejelzési modell. A h-CLAT-tal végzett előrejelzést integrált értékelési és vizsgálati megközelítés keretében, valamint az Általános bevezetés 7. és 8. pontjának rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni.

P_1: csak a CD86 tekintetében pozitív vizsgálatmenet; P_2: csak a CD54 tekintetében pozitív vizsgálatmenet; P_{12}: a CD54 és a CD86 tekintetében egyaránt pozitív vizsgálatmenet; N: sem a CD54, sem a CD86 tekintetében nem pozitív vizsgálatmenet.

*A keretekben az első két vizsgálatmenet eredményeinek releváns kombinációi szerepelnek, az eredmények sorrendjétől függetlenül.

#A keretek a három vizsgálatmenetből származó eredmények releváns kombinációit jelenítik meg az első két vizsgálatmenet fenti keretben látható eredményei alapján, nem tükrözik viszont az eredmények sorrendjét.

28. A h-CLAT vizsgálat által pozitívként előrejelzett vizsgálati vegyi anyagok esetében opcionálisan két hatáserősséget jelző koncentrációérték (EC) állapítható meg, a CD86 esetében az EC_{150} és a CD54 esetében az EC_{200}, vagyis az a koncentráció, amelynél a vizsgálati vegyi anyagok relatív fluoreszcencia-intenzitása 150, illetve 200 százalék. Ezek az EC-értékek hozzájárulhatnak a szenzibilizáló hatás erősségének értékeléséhez (9), ha az integrált vizsgálati és értékelési megközelítéshez hasonló integrált megközelítések keretében alkalmazzák őket (4) (5) (6) (7) (8). Az alábbi egyenletekkel lehet kiszámítani értéküket:

▼M8

$$EC\ 150\ (CD86\ esetén) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (CD54\ esetén) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

ahol

az A_{konc} az a μg/ml-ben megadott legalacsonyabb koncentráció, amelynél a relatív fluoreszcencia-intenzitás nagyobb mint 150 (CD86) vagy 200 (CD54)

a B_{konc} az a μg/ml-ben megadott legmagasabb koncentráció, amelynél a relatív fluoreszcencia-intenzitás kisebb mint 150 (CD86) vagy 200 (CD54)

az A_{RFI} az a legalacsonyabb koncentrációjú relatív fluoreszcencia-intenzitás, ahol a relatív fluoreszcencia-intenzitás nagyobb mint 150 (CD86) vagy 200 (CD54)

a B_{RFI} az a legmagasabb koncentrációjú relatív fluoreszcencia-intenzitás, ahol a relatív fluoreszcencia-intenzitás kisebb mint 150 (CD86) vagy 200 (CD54)

Az EC_{150} és az EC_{200} érték pontosabb meghatározása érdekében szükség lehet arra, hogy a *CD86/CD54 expresszió mérését* három független vizsgálatmenetben végezzék el. Ez esetben a végső EC_{150} és EC_{200} értéket a három független vizsgálatmenetben kiszámolt EC-értékek középértékeként határozzák meg. Amikor három független vizsgálatmenetből csupán kettőben teljesülnek a pozitív előrejelzés kritériumai (lásd a 26–27. pontot), a két kiszámított EC_{150} vagy EC_{200} érték közül a magasabbat fogadják el.

Elfogadhatósági kritériumok

29. A h-CLAT módszer alkalmazásakor az alábbi elfogadhatósági kritériumoknak kell teljesülniük (22) (27).

— A tápoldatos és az oldószeres/vivőanyagos kontroll sejtéletképességének meg kell haladnia a 90 %-ot.

— Az oldószeres/vivőanyagos kontrollban sem a CD86, sem a CD54 relatív fluoreszcencia-intenzitása nem haladhatja meg a pozitív besoroláshoz szükséges kritériumot (CD86 esetén RFI ≥ 150 % és CD54 esetén RFI ≥ 200 %). Az oldószeres/vivőanyagos kontroll relatív fluoreszcencia-intenzitását a 25. pontban szereplő képlet alapján kell kiszámolni (a „vegyi anyag MFI értéke” helyett az „oldószer/vivőanyag MFI értékét”, az „oldószer/vivőanyag MFI értéke” helyett pedig a „tápoldatos kontroll MFI értékét” kell használni).

— Mind a tápoldatos kontroll, mind az oldószeres/vivőanyagos kontroll során a CD86 és a CD54 esetében megállapított fluoreszcencia-intenzitás mértani középértékének izotípusos kontrollhoz viszonyított aránya meg kell, hogy haladja a 105 %-ot.

— A pozitív kontroll (DNCB) során a CD86 és a CD54 relatív fluoreszcencia-intenzitásának teljesítenie kell a pozitív besoroláshoz szükséges kritériumot (CD86 esetén RFI ≥ 150 és CD54 esetén RFI ≥ 200), 50 %-nál nagyobb sejtéletképesség mellett.

— A vizsgálati vegyi anyaggal elért sejtéletképességnek minden vizsgálatmenetben legalább négy vizsgált koncentrációban meg kell haladnia az 50 %-ot.

30. A negatív eredmény csak akkor elfogadható, ha a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb vizsgált koncentrációja (vagyis a 20. pontban ismertetett oldatsorozat szerint az 1,2 × CV75) 90 %-nál alacsonyabb sejtéletképességet eredményez. Amennyiben az 1,2 × CV75 koncentráció által kiváltott sejtéletképesség eléri vagy meghaladja a 90 %-ot, a negatív eredményt figyelmen kívül kell hagyni. Ilyen esetben ajánlatos a CV75 újbóli meghatározásával pontosítani a dózisválasztást. Amennyiben azonban a vizsgálati vegyi anyag maximális vizsgált koncentrációja 5 000 μg/ml sóoldatban (illetve tápoldatban vagy más oldószerben/vivőanyagban), 1 000 μg/ml DMSO-ban vagy a legmagasabb még oldható koncentráció, a negatív eredmény 90 % fölötti sejtéletképesség esetén is elfogadható.

▼M8

Vizsgálati jegyzőkönyv

31. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag

Egy összetevőből álló anyag

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— fizikai megjelenés, Log Kow, vízoldékonyság, DMSO-ban való oldhatóság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), tisztaságával, mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival (lásd fent) jellemezve; amennyiben rendelkezésre állnak;

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság, DMSO-ban való oldhatóság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— molekulatömeg vagy látszólagos molekulatömeg ismert összetételű keverékek/polimerek esetén, vagy a vizsgálat lebonyolítása szempontjából releváns egyéb információ;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Kontrollok

Pozitív kontroll

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— fizikai megjelenés, log K_{ow}, vízoldékonyság, DSMO-ban való oldhatóság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak és szükség szerint;

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

▼**M8**

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— adott esetben hivatkozás a pozitív történeti kontrollok eredményeire, amelyek a vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumainak való megfelelőséget bizonyítják.

Negatív és oldószeres/vivőanyagos kontroll

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— fizikai megjelenés, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben a vizsgálati iránymutatásban említett kontroll oldószerektől/vivőanyagoktól eltérő oldószerek/vivőanyagok használatosak, és amennyiben rendelkezésre állnak;

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Vizsgálati körülmények

— a megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe;

— az alkalmazott vizsgálat leírása;

— használt sejtvonal, annak tárolási feltételei és eredete (például az a létesítmény, ahonnan beszerezték);

— az alkalmazott áramlási citometria rendszer (pl. modell) és annak műszerbeállításai, valamint az alkalmazott globulin, ellenanyagok és citotoxicitási markerek;

— a vizsgálat végrehajtásában való, a jártassági tesztanyagok vizsgálatával megszerzett laboratóriumi jártasság bizonyítására alkalmazott eljárás és a vizsgálat idővel reprodukálható teljesítményének bizonyítására alkalmazott eljárás, pl. a dokumentált kontrolladatok és/vagy a dokumentált reaktivitási vizsgálatok adatai.

A vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

— az oldószeres/vivőanyagos kontroll során kapott sejtéletképesség, MFI és RFI az elfogadhatósági tartományokkal való összevetésben;

— a pozitív kontroll során kapott sejtéletképesség és RFI az elfogadhatósági tartományokkal való összevetésben;

— a vizsgálati vegyi anyag minden vizsgált koncentrációjában mért sejtéletképesség.

▼**M8**

A vizsgálat menete

— az alkalmazott vizsgálatmenetek száma;

— a vizsgálati vegyi anyag koncentrációi, alkalmazása és a használt expozíciós idő (ha eltér az ajánlottól);

— az alkalmazott értékelési és döntési kritériumok leírása;

— a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása.

Eredmények

— az egyes vizsgálatmenetekben a vizsgálati vegyi anyaggal és a pozitív kontrollal kapott adatok táblázatba foglalása, feltüntetve a CV75 értéket (ha alkalmazandó), a fluoreszcencia-intenzitás mértani középértékét, a relatív fluoreszcencia-intenzitást, a sejtéletképességi értékeket, az EC_{150}/EC_{200} értéket (ha alkalmazandó), valamint a vizsgálati vegyi anyag előrejelzési modell szerinti besorolását;

— adott esetben bármely más releváns észrevétel leírása.

Az eredmények tárgyalása

— a h-CLAT módszerrel kapott eredmények tárgyalása;

— a vizsgálat eredményeinek integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő tárgyalása, amennyiben rendelkezésre állnak más releváns információk.

Következtetések

SZAKIRODALOM

(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. A dokumentum az alábbi helyről elérhető: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). A dokumentum az alábbi helyről elérhető: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 A dokumentum az alábbi helyről elérhető:https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599-609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. A dokumentum az alábbi helyről elérhető:http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

▼**M8**

(19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.

(20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7^{th} report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.

(21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 pp.

(22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Elérhető a következő címen: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. Elérhető a következő címen:http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

(25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

▼M8

1.1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálattal kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálat megfelelőségének mutatója, és relevanciájának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés” szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket (21).

Káros kimeneti út (Adverse Outcome Pathway, AOP): valamely megcélzott vegyi anyag vagy hasonló vegyi anyagok csoportjának kémiai szerkezetéből kiinduló, a molekuláris kiváltó eseményen keresztül az érintett in vivo eredményig végbemenő eseménysorozat (22).

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

CV75: 75 %-os sejtéletképességet eredményező becsült koncentráció.

EC150: a CD86 expressziója során 150 %-os relatív fluoreszcencia-intenzitást eredményező koncentrációk.

EC200: a CD54 expressziója során 200 %-os relatív fluoreszcencia-intenzitást eredményező koncentrációk.

Áramlási citometria: citometrikus technika, amelyben a folyadékáramban szuszpendált sejtek egyenként áthaladnak egy fókuszált gerjesztő fénynyalábon, amely a sejtekre és összetevőire jellemző minták szerint szóródik szét; a sejteket gyakran fluoreszcens markerekkel jelölik meg, amelyek az abszorbeált fényt eltérő frekvenciákon bocsátják ki.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

Integrált vizsgálati és értékelési megközelítés: valamely vegyi anyag vagy vegyianyag-csoport veszélyeinek azonosításához (potenciál), jellemzéséhez (hatáserősség) és/vagy biztonsági értékeléséhez (potenciál, hatáserősség és expozíció) alkalmazott strukturált megközelítés, amely stratégiai szempontból beépít és mérlegel minden olyan releváns adatot, amely hozzájárul a lehetséges veszélyre és/vagy kockázatra és/vagy a további célirányos és ezért minimális vizsgálat szükségességére vonatkozó szabályozói döntéshozatalhoz.

Tápoldatos kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó kezeletlen replikátum. Ezt a mintát a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal együtt kell feldolgozni annak megállapításához, hogy az oldószer/vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

▼M8

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Pre-haptének: abiotikus átalakulás révén szenzibilizálóvá váló vegyi anyagok.

Pro-haptének: olyan vegyi anyagok, amelyek enzimatikus aktivációt igényelnek bőrszenzibilizáló hatásuk kifejtéséhez.

Relatív fluoreszcencia-intenzitás (RFI): a vegyi anyaggal kezelt sejteknél mért fluoreszcencia-intenzitás mértani középértékének (MFI) az oldószerrel/vivőanyaggal kezelt sejteknél mért fluoreszcencia-intenzitás mértani középértékéhez viszonyított relatív értéke.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálat pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (21).

Megbízhatóság: a vizsgálat laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik (21).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollal és egy pozitív kontrollal.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálat pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálat relevanciájának megítélésében (21).

Festő puffer: 0,1 % borjú szérum albuminnal kiegészített foszfátpuffert tartalmazó sóoldat.

Oldószeres/vivőanyagos kontroll: valamely vizsgálati rendszernek a vizsgálati vegyi anyagon kívüli összes összetevőjét tartalmazó kezeletlen minta, amely azonban magában foglalja az alkalmazott oldószert/vivőanyagot. Az ugyanabban az oldószerben/vivőanyagban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyaggal kezelt minták esetében a kiindulási érték létrehozásához használatos. Párhuzamos tápoldatos kontrollal elvégzett vizsgálata esetén ez a minta azt is bizonyítja, hogy az oldószer/vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Specificitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (21).

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

▼**M8**

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (23).

UVCB: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

Érvényes vizsgálat: olyan vizsgálat, amely kellően relevánsnak és megbízhatónak minősül egy adott célra, és amely tudományosan megalapozott elveken alapul. Egy-egy vizsgálat abszolút értelemben soha nem érvényes, kizárólag meghatározott céllal összefüggésben (21).

▼M8

1.2. függelék

JÁRTASSÁGI TESZTANYAGOK

A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak igazolniuk kell szakmai jártasságukat oly módon, hogy az 1. táblázatban javasolt 10 anyagra vonatkozóan a h-CLAT vizsgálattal várható előrejelzést helyesen kapják meg, továbbá a 10 jártassági tesztanyag közül legalább 8 esetében referenciatartományba eső CV75, EC_{150} és EC_{200} értékeket kapnak. A jártassági tesztanyagok kiválasztása oly módon történt, hogy az a bőrszenzibilizáció veszélye esetén bekövetkező különféle válaszreakciók tartományát illetően reprezentatív legyen. A kiválasztás többi kritériuma az volt, hogy a vegyi anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, azokra vonatkozóan kiváló minőségű in vivo referenciaadatok álljanak rendelkezésre, és a h-CLAT módszer alapján kiváló minőségű in vitro adatok álljanak rendelkezésre. A h-CLAT módszerhez rendelkezésre állnak publikált referenciaadatok is (3) (14).

1. táblázat

A h-CLAT módszerben való szakmai jártasság bizonyításához ajánlott anyagok

Jártassági tesztanyagok	CAS-szám	Halmazállapot	In vivo előrejelzés ([1])	CV75 referencia-tartomány µ g/ml-ben ([2])	h-CLAT eredmények CD86 esetén (EC_{150} referencia-tartomány µg/ml-ben) ([2])	h-CLAT eredmények CD54 esetén (EC_{200} referencia-tartomány µg/ml-ben) ([2])
2,4-dinitro-klór-benzol	97-00-7	Szilárd	Szenzibilizáló (szélsőségesen)	2-12	Pozitív (0,5-10)	Pozitív (0,5-15)
4-Fenilén-diamin	106-50-3	Szilárd	Szenzibilizáló (erősen)	5-95	Pozitív (<40)	Negatív (>1,5) ([3])
Nikkel-szulfát	10101-97-0	Szilárd	Szenzibilizáló (mérsékelten)	30-500	Pozitív (<100)	Pozitív (10–100)
2-merkapto-benzotiazol	149-30-4	Szilárd	Szenzibilizáló (mérsékelten)	30-400	Negatív (>10) ([3])	Pozitív (10-140)
R(+)-limonén	5989-27-5	Folyadék	Szenzibilizáló (enyhén)	>20	Negatív (>5) ([3])	Pozitív (<250)
Imidazolidinil-urea	39236-46-9	Szilárd	Szenzibilizáló (enyhén)	25–100	Pozitív (20-90)	Pozitív (20-75)
Izopropanol	67-63-0	Folyadék	Nem szenzibilizáló	>5 000	Negatív (>5 000)	Negatív (>5 000)
Glicerin	56-81-5	Folyadék	Nem szenzibilizáló	>5 000	Negatív (>5 000)	Negatív (>5 000)
Tejsav	50-21-5	Folyadék	Nem szenzibilizáló	1500-5 000	Negatív (>5 000)	Negatív (>5 000)
4-Aminobezoesav	150-13-0	Szilárd	Nem szenzibilizáló	> 1 000	Negatív (>1 000)	Negatív (>1 000)

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám.

([1]) Az in vivo veszélyekre (és a hatáserősségre) vonatkozó előrejelzés LLNA-adatokon alapul (3) (14). Az in vivo hatáserősség levezetése az ECETOC által javasolt kritériumok segítségével történik (24).

([2]) A megfigyelt dokumentált értékek alapján (13) (25).

([3]) Az ismert adatok alapján többnyire negatív eredményeket hozott ez a marker, ezért az esetek többségében negatív eredmény várható. A megadott tartományt a néhány pozitív történeti eredmény alapján határozták meg. Pozitív eredmény esetén az EC-értéknek az ismert referenciatartományon belül kell lennie.

▼M8

2. függelék

IN VITRO BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: U937 SEJTVONAL AKTIVÁLÁSI VIZSGÁLAT (U-SENS™)

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

1. Az U-SENS™ vizsgálat mennyiségileg meghatározza az U937 humán hisztiocitikus limfóma sejtvonal monocitáinak és dendritikus sejtjeinek a szenzibilizáló anyagokkal való kezelést követően beinduló aktivációs folyamata által a sejtfelületi marker (CD86) expressziójában előidézett változást (1). A CD86 sejtfelületi marker U937 sejtvonalban mért expressziós szintjét felhasználják a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására.

2. Az U-SENS™ vizsgálatot egy, a L'Oréal által koordinált validálási vizsgálatban (2) értékelték, majd az állatkísérletek alternatív módszereinek uniós referencialaboratóriumának (EURL ECVAM) tudományos tanácsadó bizottsága (ESAC) elvégezte a vizsgálat független szakértői értékelését (3). A rendelkezésre álló bizonyítékok, valamint a szabályozó hatóságok és az érdekeltek álláspontja alapján az U-SENS™ vizsgálatot az EURL ECVAM (4) integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő alkalmazásra ajánlotta, a bőrszenzibilizáló és nem szenzibilizáló anyagok veszélyességi osztályozás és címkézés céljából történő megkülönböztetésének alátámasztására. A bőrszenzibilizációs integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében alkalmazott adatintegrálás és egyedi információforrások strukturált megközelítéseire vonatkozó jelentéstételről szóló iránymutatásában az OECD beszámol számos, különböző vizsgálati stratégiát és előrejelzési modellt ismertető esettanulmányról. A különféle kidolgozott megközelítések egyike az U-SENS™ vizsgálaton alapul (5). Az U-SENS™ alkalmazásából származó adatok és más információk, egyebek mellett a dokumentált adatok és az ismert hiteles humán adatok (6) együttes használatára a szakirodalom hoz példákat (4) (5) (7).

3. Az U-SENS™ vizsgálatról bebizonyosodott, hogy áthelyezhető a sejttenyésztési technikák és az áramlási citometriás elemzés terén tapasztalattal rendelkező laboratóriumokba. A vizsgálattól várható előrejelzések reprodukálhatóságának mértéke laboratóriumon belül mintegy 90 %, laboratóriumok között pedig 84 % (8). A validálási vizsgálatban (8) és más közzétett tanulmányokban (1) kapott eredmények összességében azt jelzik, hogy az U-SENS™ a bőrszenzibilizáló (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) anyagokat az LLNA vizsgálati módszer eredményeihez képest 86 %-os (N=166) pontossággal különbözteti meg a nem szenzibilizáló anyagoktól, 91 % az érzékenysége (118/129), a specifikussága pedig 65 % (24/37). A humán vizsgálatokból származó eredményekkel összevetve a bőrszenzibilizáló (vagyis az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) anyagokat 77 %-os (N=101) pontossággal különbözteti meg a nem szenzibilizáló anyagoktól, 100 % az érzékenysége (58/58), míg a specifikussága 47 % (20/43). Az LLNA módszerrel összevetve az U-SENS™ nagyobb valószínűséggel ad hamis negatív előrejelzést olyan vegyi anyagoknál, amelyeknek alacsonytól mérsékeltig terjedő a szenzibilizáló hatása (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1B. alkategóriába tartozó anyagoknál), mint a rendkívül bőrszenzibilizáló hatást mutató vegyi anyagoknál (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1A. alkategóriába tartozó anyagoknál) (1) (8) (9). Ezek az információk összességében azt jelzik, hogy az U-SENS™ vizsgálat érdemben hozzájárul a bőrszenzibilizáció veszélyének azonosításához. Az U-SENS™ mint önálló vizsgálat esetében itt megadott pontossági értékek azonban csak irányadóak, ugyanis a vizsgálatot az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében más információforrásokkal együtt és az Általános bevezetés 7. és 8. pontjának rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni. Ezen túlmenően a bőrszenzibilizáció nem állatokon alkalmazott módszereinek értékelésekor nem szabad megfeledkezni arról, hogy az LLNA vizsgálat, valamint más állatkísérletek nem feltétlenül tükrözik teljes egészében az embernél fennálló helyzetet.

▼M8

4. A jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján az U-SENS™ vizsgálatról megállapították, hogy alkalmazható különféle szerves funkciós csoportokat, fizikai-kémiai tulajdonságokat, (in vivo vizsgálatok során meghatározott) bőrszenzibilizáló hatásokat és a bőrszenzibilizációval összefüggésbe hozható reakciómechanizmusok spektrumát (Michael-akceptor, Schiff-bázis képződés, aciltranszfer ágens, bimolekuláris nukleofil szubsztitúció [SN2] vagy aromás nukleofil szubsztitúció [SNAr]) képviselő vizsgálati vegyi anyagokra (ezen belül kozmetikai összetevőkre, pl. tartósítószerekre, felületaktív anyagokra, hatóanyagokra, festékekre) (1) (8) (9) (10). Az U-SENS™ vizsgálat olyan vizsgálati vegyi anyagokra alkalmazandó, amelyek megfelelő oldószerben/vivőanyagban (lásd a 13. pontot) oldhatók vagy azokkal stabil diszperziót alkotnak (azaz olyan kolloidot vagy szuszpenziót, amelyben a vizsgálati vegyi anyag nem ülepedik le, illetve nem válik szét az oldószertől/vivőanyagtól különböző fázisokra). Az U-SENS™ megfelelően előrejelezte azon vegyi anyagok besorolását is, amelyek az adatbázisban pre-hapténokként (oxidációval aktiválódó anyagokként) vagy pro-hapténokként (például a P450 enzim közreműködésével enzimatikus aktivációt igénylő anyagokként) tartottak nyilván (1) (10).A membránt károsító anyagok viszont álpozitív eredményre vezethetnek a CD86 expressziójának nem specifikus növelése miatt, mivel az in vivo referenciabesoroláshoz képest kapott 7 álpozitív eredményből 3 felületaktív anyagnál fordult elő (1). Bár a felületaktív anyagokkal elért pozitív eredményeket körültekintően kell mérlegelni, a felületaktív anyagok negatív eredménye használható a vizsgálati vegyi anyag nem bőrszenzibilizáló anyagként való azonosításának alátámasztására. Az U-SENS™ vizsgálat alkalmas fluoreszcens vizsgálati vegyi anyagok értékelésére (1), mindazonáltal azok az erősen fluoreszcens vizsgálati vegyi anyagok, amelyek a fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC), illetve a propídium-jodiddal (PI) azonos hullámhosszon bocsátják ki a fényt, zavarják az áramlási citometriás észlelést, ezért FITC-vel összekapcsolt ellenanyagokkal (potenciális hamis negatív eredmény), illetve propídium-jodiddal (nem mérhető életképesség) nem értékelhetők megfelelően. Ilyen esetben használhatók más fluorokrómmal jelzett ellenanyagok vagy más citotoxicitási markerek, ha például a 2.2. függelékben szereplő jártassági tesztanyagok vizsgálata révén bizonyítást nyert, hogy a FITC-vel jelzett ellenanyagokhoz vagy a propídium-jodidhoz (lásd a 18. pontot) hasonló eredményt biztosítanak. A fentiek fényében: a felületaktív anyagokkal kapott pozitív eredményeket és az erősen fluoreszcens vizsgálati vegyi anyagokkal elért negatív eredményeket a közölt korlátokra tekintettel és az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretébe tartozó egyéb információforrásokkal összefüggésben kell értelmezni. Olyan esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy az U-SENS™ vizsgálat nem alkalmazható más, konkrét vegyianyag-kategóriákra, a vizsgálatot nem szabad e vegyianyag-kategóriákra alkalmazni.

5. A fentieknek megfelelően az U-SENS™ vizsgálat elősegíti a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetését. Hozzájárulhat azonban a szenzibilizáló hatás erősségének értékeléséhez is, ha az integrált vizsgálati és értékelési megközelítéshez hasonló integrált megközelítések keretében alkalmazzák. Lehetőleg humán adatokon alapuló további munkára van azonban szükség annak meghatározásához, hogy az U-SENS™ eredményei hogyan járulhatnak hozzá a hatáserősség vizsgálatához.

6. A fogalommeghatározások a 2.1. függelékben találhatók.

A Vizsgálat Elve

7. Az U-SENS™ vizsgálat egy in vitro eljárás, amely a vizsgálati vegyi anyaggal való 45 ±3 órás kezelést követően mennyiségileg meghatározza a CD86 sejtfelületi markernek egy humán hisztiocitikus limfóma sejtvonal, az U937 sejtekben történő kifejeződésében előidézett változásokat. A CD86 sejtfelületi marker az U937 sejtek aktivációjának egyik jellegzetes markere. A CD86 egy ismert kostimuláló molekula, amely képes imitálni a monociták aktivációját, ami kulcsszerepet játszik a T-sejtek elsődleges aktiválásában. A CD86 sejtfelületi marker expresszziójának változásait áramlási citometriával mérik, miután a sejteket megfestették, többnyire fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelzett ellenanyagokkal. Ezzel egyidejűleg citotoxicitás-méréseket is végeznek (például propídium-jodiddal) annak felméréséhez, hogy a citotoxikus koncentrációknál alacsonyabb koncentráció

▼M8

mellett fokozódik-e a CD86 felületi marker expressziója. Meghatározzák a CD86 felületi marker oldószeres/vivőanyagos kontrollhoz viszonyított stimulációs indexét (S.I.), amit felhasználnak az előrejelzési modellben (lásd a 19. pontot) a bőrszenzibilizáló és nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására.

A Jártasság Bizonyítása

8. A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak a 2.2. függelékben felsorolt tíz jártassági tesztanyag in vitro módszerekre vonatkozó bevált gyakorlatokkal összhangban történő felhasználásával igazolniuk kell szakmai jártasságukat (11). Ezenfelül a vizsgálat felhasználóinak történeti adatbázist kell fenntartaniuk, amely tartalmazza a reaktivitási tesztekből (lásd a 11. pontot), valamint a pozitív és az oldószeres/vivőanyagos kontrollokból (lásd a 15–16. pontot) származó adatokat, ezekkel az adatokkal igazolva a vizsgálat laboratóriumon belüli hosszú távú reprodukálhatóságát.

Eljárás

9. Ez a vizsgálat az állatkísérletek alternatív módszereire vonatkozó adatbázis-szolgáltatás (DB-ALM) U-SENS™-t érintő 183. protokollján (12) alapul. Az U-SENS™ vizsgálat laboratóriumi végrehajtása és igénybevétele során alkalmazni kell a szabványműveleti eljárásokat. Az U-SENS™ vizsgálat automatizált rendszerrel is elvégezhető, ha például a 2.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok vizsgálatával kimutatták, hogy hasonló eredményekre vezet. Az alábbiakban az U-SENS™ főbb összetevőinek és eljárásainak leírása található.

Sejtek előkészítése

10. Az U-SENS™ vizsgálat végrehajtásához az U937 humán hisztiocitikus limfóma sejtvonalat (13) kell használni. Ajánlatos a (CRL1593.2 klón) sejteket egy megfelelő minősítéssel rendelkező sejtbankból, például az Amerikai Fajtakultúra Gyűjteményből beszerezni.

11. Az U937 sejteket 10 % magzati borjú szérummal (FCS), 2 mM L-glutaminnal, 100 egység/ml penicillinnel és 100 μg/ml sztreptomicinnel kiegészített RPMI-1 640 tápoldatban (teljes tápoldat), valamint 37 °C-os, 5 %-os CO_2-tartalmú és vízgőzzel telített környezetben kell tenyészteni. Az U937 sejteket 2 vagy 3 naponta 1,5 vagy 3×10^5 sejt/ml sűrűségben rutinszerűen passzálják. A sejtsűrűség nem lépheti túl a 2×10^6 sejt/ml mennyiséget, a tripankék festékkizárásos teszttel mért sejtéletképességnek pedig legalább 90 %-osnak kell lennie (ez a felolvasztást követő első passzálásra nem vonatkozik). A vizsgálatban való felhasználásuk előtt a sejtek, a magzati borjú szérum és az ellenanyagok minden tételét egy reaktivitási teszt során minősíteni kell. A sejtek reaktivitási tesztjét a pozitív kontrollanyaggal, a pikrilszulfonsavval (2,4,6-trinitro-benzol-szulfonsav: TNBS) (CAS-száma: 2 508-19-2, legalább 99 %-os tisztaságban) és a negatív kontrollanyaggal, a tejsavval (LA) (CAS-száma: 50-21-5, legalább 85 %-os tisztaságban) kell végrehajtani, legalább egy héttel a felolvasztásukat követően. A reaktivitási tesztben mindkét kontrollanyag esetén hat végső koncentrációt kell tesztelni (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 μg/ml és tejsav: 1, 10, 20, 50, 100, 200 μg/ml). A teljes tápoldatban feloldott TNBS-nak a CD86 pozitív és koncentrációfüggő válaszát kell előidéznie (pl. amikor egy pozitív eredményt, vagyis legalább 150-es CD86 S.I. értéket adó koncentrációt követő koncentráció-érték a CD86 ennél magasabb S.I. értékét váltja ki), a teljes tápoldatban feloldott tejsavnak pedig a CD86 negatív válaszát kell előidéznie (lásd a 21. pontot). A vizsgálathoz kizárólag a reaktivitási tesztben 2 alkalommal megfelelt sejttételek használhatók. A sejtek a felolvasztásukat követően hét hétig szaporíthatók. A sejteket legfeljebb 21 alkalommal szabad passzálni. A reaktivitási tesztet a 18-22. pontban leírt eljárások szerint kell végrehajtani.

▼M8

12. A vizsgálathoz az U937 sejteket vagy 3×10^5 sejt/ml vagy 6×10^5 sejt/ml sűrűségben átoltják, majd sejttenyésztő lombikban az előbbi esetben 2 napig, az utóbbiban pedig 1 napig előtenyésztik. A fentiektől eltérő előtenyésztési körülmények is alkalmazhatók, ha megfelelő tudományos indokolással támasztják alá alkalmazásukat, és ha például a 2.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok vizsgálatával kimutatták, hogy hasonló eredményekhez vezetnek. A vizsgálat napján a sejttenyésztő lombikból begyűjtött sejteket frissen készített tápfolyadékban 5×10^5 sejt/ml sűrűségben újraszuszpendálják. Ezt követően a sejteket egy 96 lyukú, lapos fenekű lemezre helyezik 100 µl mennyiségben (lyukanként $0{,}5 \times 10^5$ sejt végső sejtsűrűségben).

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok előkészítése

13. A vizsgálat előtt felmérik az anyagok oldhatóságát. Ebből a célból a vizsgálati vegyi anyagokat 50 mg/ml koncentrációban feloldják vagy stabilan diszpergálják teljes tápoldatban, mint az első számú oldószer választás, vagy dimetil-szulfoxidban (DMSO, ≥ 99 %-os tisztaságban), mint második oldószer/vivőanyag választás, ha a vizsgálati vegyi anyag a teljes tápoldatos oldószerben/vivőanyagban nem oldható. A vizsgálati vegyi anyagot a vizsgálathoz 0,4 mg/ml végső koncentrációban oldják fel a teljes tápoldatban, amennyiben a vegyi anyag oldható ebben az oldószerben/vivőanyagban. Ha a vegyi anyag csak DMSO-ban oldható, akkor 50 mg/ml-es koncentrációban oldják fel. A fentiektől eltérő oldószerek/vivőanyagok megfelelő tudományos indokolással szintén használhatók. Figyelembe kell venni azt is, hogy a vizsgálati vegyi anyag mennyire stabil a végső oldószerben/vivőanyagban.

14. A vizsgálati vegyi anyagokat és a kontrollanyagokat a vizsgálat napján kell előkészíteni. Mivel dózisbehatároló vizsgálatra nem kerül sor, az első vizsgálatmenetben 6 végső koncentrációt kell vizsgálni (1, 10, 20, 50, 100 és 200 µg/ml) a megfelelő oldószerben/vivőanyagban, amely vagy a teljes tápoldat, vagy 0,4 % DMSO-t tartalmazó tápoldat. A további vizsgálatmenetekben a megfelelő oldószerben/vivőanyagban legalább 4 munkaoldatot (vagyis legalább 4 koncentrációt) kell készíteni a vizsgálati vegyi anyagokból 0,4 mg/ml-től kezdve teljes tápoldat használata esetén, vagy 50 mg/ml-től kezdve DMSO használata esetén. A munkaoldatokat végül felhasználják a kezeléshez, ehhez a további kétszeres hígítás (12) érdekében a lemezbe helyezett munkaoldat térfogatával megegyező térfogatú U937 sejtszuszpenziót (lásd a fenti 11. pontot) adagolnak a munkaoldatokhoz. Az esetleges további vizsgálatmenetekben alkalmazott legalább 4 koncentrációt az előző vizsgálatmenetek eredményei alapján határozzák meg (8). A következő végső koncentrációértékek használhatók: 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 és 200 µg/ml. A maximális végső koncentráció a 200 µg/ml. Amennyiben a CD86 már 1 µg/ml koncentrációnál pozitív választ eredményez, akkor a 0,1 µg/ml koncentráció értékelésével megkeresik a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációját, amely nem indukál pozitív küszöbérték feletti CD86 kifejeződést. Ha a CD86 kifejeződés során pozitív koncentráció-válasz figyelhető meg, minden vizsgálatmenetben ki kell számolni az EC_{150} értéket (ez a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amelynél a CD86 eléri a pozitív besoroláshoz szükséges 150 %-os küszöbértéket, lásd a 19. pontot). Amikor a vizsgálati vegyi anyag által előidézett pozitív CD86 válasz nem hozható összefüggésbe a koncentrációval, akkor előfordulhat, hogy az U-SENS™-re vonatkozó 183. sz. DB-ALM protokollban leírtak szerint (12) az EC_{150} érték a vizsgálat szempontjából nem releváns. Amikor csak lehetséges, minden vizsgálatmenetben meg kell határozni CV70 értéket (12) (ez a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amelynél a citotoxicitás eléri a 70 %-os küszöbértéket, lásd a 19. pontot). Annak megállapításához, hogy a CD86 expresszió növekedése összefüggésben áll-e a koncentráció növekedésével, a használható koncentrációk közül kiválasztott koncentrációértékeknek egyenletesen kell eloszlaniuk az EC_{150} (vagy a legmagasabb, még negatív eredményhez vezető, nem citotoxikus koncentráció) és a CV70 (vagy a megengedett legmagasabb koncentráció, vagyis 200 µg/ml) között. Vizsgálatmenetenként legalább 4 koncentrációt kell vizsgálni, amelyek közül legalább kettőnek meg kell egyeznie az előző vizsgálatmenet(ek)ben alkalmazott koncentrációkkal, hogy összehasonlíthatók legyenek az eredmények.

▼M8

15. Az U-SENS™ vizsgálatban alkalmazott oldószeres/vivőanyagos kontroll a teljes tápoldat (a teljes tápoldatban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyagok esetében) (lásd a 4. pontot) vagy a 0,4 % DMSO-t tartalmazó teljes tápoldat (a DMSO-ban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyagok esetében).

16. Az U-SENS™ vizsgálat során használt pozitív kontrollanyag a TNBS (lásd a 11. pontot), amelyet teljes tápoldatban készítenek el. A CD86 expresszió mérésénél pozitív kontrollanyagként használt TNBS-t egyetlen végső (50 μg/ml) koncentrációban vizsgálják a lemezen, amely 70 % feletti sejtéletképességet biztosít. Ahhoz, hogy 50 μg/ml koncentrációjú TNBS kerüljön a lemezre, teljes tápoldatban elkészítik a TNBS 1 M (azaz 293 mg/ml) koncentrációjú törzsoldatát, majd a törzsoldatot teljes tápoldattal a 2 930-szorosára hígítva elkészítik a 100 μg/ml koncentrációjú munkaoldatot. Negatív kontrollanyagként tejsavat (LA, CAS-száma: 50-21-5) kell alkalmazni, teljes tápoldatban 200 μg/ml koncentrációban feloldva (amelyet 0,4 mg/ml koncentrációjú törzsoldatból készítenek el). Minden vizsgálatmenet valamennyi lemezén a teljes tápoldatból álló kezeletlen kontrollt, az oldószeres/vivőanyagos kontrollt, a negatív és a pozitív kontrollt egyaránt triplikátumban kell elkészíteni (12). Alkalmazhatók más, megfelelő pozitív kontrollok is, ha rendelkezésre állnak dokumentált adatok hasonló vizsgálatmenet-elfogadhatósági kritériumok származtatásához. A vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumai megegyeznek a vizsgálati vegyi anyag elfogadhatósági kritériumaival (lásd a 12. pontot).

A vizsgálati vegyi anyagok és a kontrollanyagok alkalmazása

17. A 14–16. pontban leírt módon elkészített oldószeres/vivőanyagos kontrollt vagy munkaoldatokat 1: 1 térfogatszázalék arányban összekeverik a 96 lyukú lapos fenekű lemezen elkészített sejtszuszpenziókkal (lásd a 12. pontot). A kezelt lemezeket ezt követően 45 óráig (±3 óra) 37 °C-on 5 % CO_2 jelenlétében inkubálják. Inkubálás előtt a lemezeket félig áteresztő membránnal lezárják, hogy megelőzzék az illékony vizsgálati vegyi anyagok elpárolgását és a vizsgálati vegyi anyagokkal kezelt sejtek közötti keresztszennyeződés kialakulását (12).

Sejtfestés

18. A 45 órás (±3 óra) inkubálást követően a sejteket V-aljú mikrotiterlemezekbe helyezik át és centrifugálással kinyerik őket. A vizsgálat kimenetelét zavaró oldhatósági problémát jelez, ha a 45 ±3 órás kezelés utáni inkubálást követően (még sejtfestés előtt) mikroszkóp alatt kristályok vagy cseppek figyelhetők meg. A felülúszót eltávolítják, a maradék sejteket pedig egyszer átmossák 100 μl jéghideg, 5 % magzati borjú szérummal kiegészített, foszfátpuffert tartalmazó sóoldattal (festő pufferrel). A centrifugálást követően a sejteket 100 μl festő pufferben újraszuszpendálják, majd 30 percen keresztül, 4 °C-on, fénytől védve megfestik 5 μl (pl. 0,25 μg) FITC-vel jelzett anti-CD86 vagy egér IgG1 (izotípus) ellenanyagokkal. Az U-SENS™-re vonatkozó 183. sz. DB-ALM protokollban (12) leírt ellenanyagokat kell használni (a CD86 esetében: BD-PharMingen #5556 57 Fun-1 klón vagy Caltag/Invitrogen #MHCD8601 BU63 klón; az IgG1 esetében: BD-PharMingen #5557 48 vagy Caltag/Invitrogen #GM4992). A vizsgálat kidolgozói által szerzett tapasztalatok arra utalnak, hogy az ellenanyagok fluoreszcencia-intenzitása a különböző tételeknél általában konzisztens. A vizsgálathoz használhatók a reaktivitási tesztben megfelelt egyéb ellenanyag klónok vagy forgalmazók is (lásd a 11. pontot). A legmegfelelőbb vizsgálati koncentráció meghatározásához azonban a felhasználók fontolóra vehetik az ellenanyagok saját laboratóriumi körülményeik mellett történő titrálását. Más detektálási rendszerek, többek között fluorokrómmal jelzett anti-CD86 ellenanyagok is alkalmazhatók, amennyiben például a 2.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok tesztelésével kimutatták, hogy a FITC-vel összekapcsolt ellenanyagokhoz hasonló eredményekre vezetnek. Miután 100 μl festő

▼M8

pufferrel kétszer, 100 µl jéghideg PBS-sel egyszer átmosták a sejteket, újraszuszpendálják őket jéghideg PBS-ben (pl. 125 µl-ben, ha a mintákat manuálisan, csövenként elemzik, vagy 50 µl-ben, ha automatikus mintavevő lemezt használnak), majd propídium-jodid oldatot adnak hozzájuk (3 µg/ml végső koncentrációban). Más citotoxicitási markerek – például 7-amino-aktinomicin D (7-AAD) vagy tripankék – is alkalmazhatók, amennyiben az alternatívaként használt festékről például a 2.2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok vizsgálatával kimutatták, hogy a propídium-jodidhoz hasonló eredményekre vezet.

Áramlási citometria elemzés

19. A CD86 expressziójának mértékét és a sejtéletképességet áramlási citometriával elemzik. A sejteket a méretük (FSC, előrefelé irányuló szórás) és granuláltságuk (SCC, oldalra irányuló szórás) alapján felhődiagramon (logaritmikus skálán) ábrázolják, amely lehetővé teszi az első kapun (R1) kiválasztott sejtpopuláció egyértelmű azonosítását és a sejttöredékek eltávolítását. Lyukanként összesen 10 000 célsejt adatait gyűjtik össze az R1 kapuzás során. Az azonos R1 kapunál mért sejteket FL3 vagy FL4/SSC arányt vizsgáló felhődiagramon jelenítik meg. Az élő sejteket egy második, R2 kapu elhelyezésével különítik el, amelynek segítségével kiválasztják a propídium-jodid negatív sejtpopulációt (FL3 vagy FL4 csatorna). A sejtéletképességet az alábbi egyenlet alapján kalkulálja ki a citométer elemzőprogramja. Alacsony sejtéletképességnél az elhalt sejtekkel együtt akár 20 000 sejt adatait is összegyűjthetik. Ennek alternatívája lehet az, amikor az adatokat az elemzés elindításától számítva egy percen át gyűjtik.

$$\textit{Sejtéletképesség} = \frac{\textit{élő sejtek száma}}{\textit{összegyűjtött sejtek száma összesen}} \times 100$$

Ezt követően megmérik az R2 kapuval kiválasztott élő sejtek közötti FL1 pozitív sejtek arányát (R1-en belül). Az élő sejteken (R2) a CD86 sejtfelületi kifejeződését FL1/SSC arányt vizsgáló felhődiagrammal elemzik.

A teljes tápoldatot/IgG1-et tartalmazó lyukak esetében az elemző markert a fő sejtpopuláció közelébe helyezik, hogy a teljes tápoldat kontrollok IgG1 ellenanyagai a 0,6–0,9 %-os céltartományba essenek.

A színinterferenciát az FITC-vel jelzett IgG1 felhődiagram eltolódása jelzi (IgG1 FL1 S.I. mértani középértéke ≥ 150 %).

A kezeletlen vagy 0,4 %-os DMSO-val kezelt kontrollsejtek és a vegyi anyaggal kezelt sejtek CD86 expressziójának stimulációs indexét (S.I.) az alábbi egyenlettel számítják ki:.

$$S.I. = \frac{\text{CD86}^{+}\text{kezelt sejtek \%} - \text{a} - \text{IgG1}^{+}\textit{kezelt sejtek \%} - \text{a}}{\text{CD86}^{+}\text{kontrollsejtek \%} - \text{a} - \text{IgG1}^{+}\text{kontrollsejtek \%}} \times 100$$

A kezeletlen kontrollsejtek $IgG1^{+}$ aránya: az elemző markerrel jelölt FL1 pozitív IgG1 sejtek aránya (elfogadhatósági tartomány: legalább 0,6 % és kisebb mint 1,5 %, lásd a 22. pontot) az élő kezeletlen sejtekhez képest.

A kontroll/kezelt sejtek $IgG1^{+}/CD86^{+}$ aránya: az FL1 pozitív IgG1/CD86 sejtek elemző marker áthelyezése nélkül mért aránya az élő kontroll/kezelt sejtekhez képest.

▼**M8**

Adatok És Jelentés

Az adatok kiértékelése

20. Az U-SENS™ vizsgálatban az alábbi paramétereket kell kiszámítani: CV70 érték, vagyis az a koncentráció, amely az U937 sejtek 70 %-os túlélését eredményezi (30 %-os citotoxicitás) és az EC_{150} érték, vagyis az a koncentráció, amelynél a vizsgálati vegyi anyag 150 %-os CD86 stimulációs indexet (S.I.) idéz elő.

A CV70 értéket logaritmikus-lineáris interpolációval számítják ki, az alábbi egyenlet alapján:

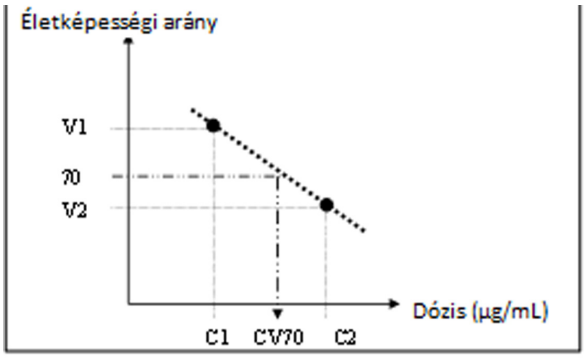
CV70 = C1 + [(V1 – 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)]

ahol:

V1 = a 70 % feletti sejtéletképesség minimumértéke

V2 = a 70 % alatti sejtéletképesség maximumértéke

C1 és C2 = a V1 és V2 sejtéletképességet előidéző koncentráció



A CV70 érték más módon is meghatározható, amennyiben (pl. a jártassági tesztanyagok tesztelésével) igazolható, hogy az nem befolyásolja az eredményt.

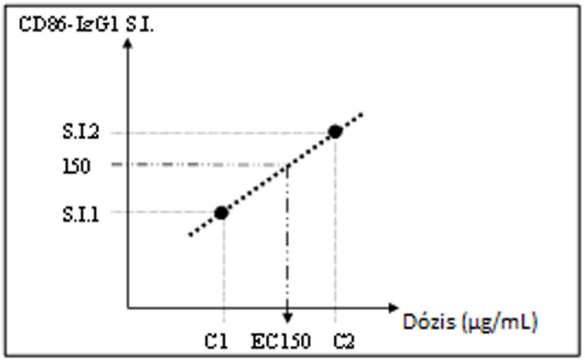
A EC150 értéket logaritmikus-lineáris interpolációval számítják ki, az alábbi egyenlet alapján:

EC150 = C1 + [(150 – S.I.1) / (S.I.2 – S.I.1) * (C2 – C1)]

ahol:

C1 az a µg/ml-ben megadott legmagasabb koncentráció, amelynél a CD86 stimulációs indexe kisebb mint 150 % (S.I. 1);

C2 az a µg/ml-ben megadott legalacsonyabb koncentráció, amelynél a CD86 stimulációs indexe legalább 150 % (S.I. 2).



▼**M8**

Az EC150 és CV70 érték kiszámolása

— minden vizsgálatmenet esetében: az egyes EC150 és CV70 értékek annak meghatározására szolgálnak, hogy a CD86 expressziójának növekedése összefüggésben áll-e a koncentráció növekedésével (lásd a 14. pontot),

— az átlagos sejtéletképesség alapján meghatározzák az összesített CV70 értéket (12),

— a CD86 értékek átlagos stimulációs indexe alapján meghatározzák az összesített EC150 értéket, amely szerint az U-SENS™ vizsgálatban előrejelzik a vizsgálati vegyi anyag POZITÍV besorolását (lásd a 21. pontot) (12).

Előrejelzési modell

21. A CD86 expressziós mérésnél minden vizsgálati vegyi anyagot legalább négy koncentrációban és legalább két független (különböző napokon végzett) vizsgálatmenetben tesztelnek, amelyek alapján meghatározzák a (NEGATÍV vagy POZITÍV) előrejelzést.

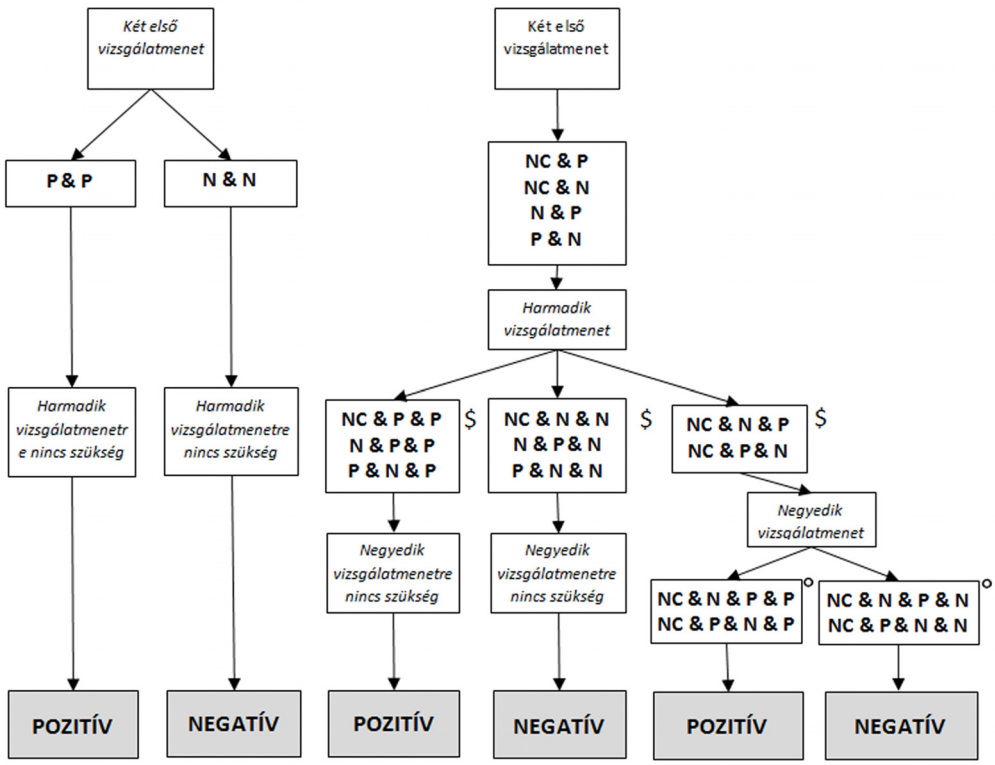
— Az U-SENS™ vizsgálat egyes vizsgálatmeneteinek eredménye akkor negatív (a továbbiakban N), ha a CD86 stimulációs indexe valamennyi nem citotoxikus koncentrációban (amikor a sejtéletképesség $\geq$ 70 %) kisebb mint 150 %, és ha nem állt elő a vizsgálat kimenetelét zavaró körülmény (citotoxicitási, oldhatósági interferencia: lásd a 18. pontot, vagy színinterferencia: lásd a 19. pontot, függetlenül az interferenciát előidéző nem citotoxikus koncentrációktól). Minden más esetben: a CD86 stimulációs indexe eléri vagy meghaladja a 150 %-ot és/vagy interferenciát figyeltek meg, akkor az U-SENS™ egyes vizsgálatmeneteinek eredménye pozitív (a továbbiakban P).

— Az U-SENS™ vizsgálat előrejelzése akkor tekinthető NEGATÍVNAK, ha legalább két független vizsgálatmenet negatív (N) eredménnyel zárult (1. ábra). Ha az első két vizsgálatmenet mindegyike negatív (N) eredményre vezetett, az U-SENS™ vizsgálat előrejelzése NEGATÍVNAK minősül, és harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség.

— Az U-SENS™ vizsgálat előrejelzése akkor tekinthető POZITÍVNAK, ha legalább két független vizsgálatmenet pozitív (P) eredménnyel zárult (1. ábra). Ha az első két vizsgálatmenet mindegyike pozitív (P) eredményre vezetett, az U-SENS™ vizsgálat előrejelzése POZITÍVNAK minősül, és harmadik vizsgálatmenetre nincs szükség.

— Mivel dózisbehatároló vizsgálatra nem kerül sor, ez alól kivételt képez az az eset, amikor az első vizsgálatmeneten a CD86 stimulációs indexe csak a legmagasabb nem citotoxikus koncentrációban éri el vagy haladja meg a 150 %-ot. Ekkor a vizsgálatmenetet NEM MEGGYŐZŐNEK (NC) kell tekinteni, és újabb vizsgálatmenetekben meg kell vizsgálni további, a legmagasabb nem citotoxikus koncentráció és a legalacsonyabb citotoxikus koncentráció közé eső koncentrációértékeket (lásd a 20. pontot). Amennyiben valamely vizsgálatmenetet nem meggyőzőnek értékelnek, legalább két további vizsgálatmenetet kell lefolytatni, illetve egy negyediket is, ha a 2. és a 3. vizsgálatmenet eredményei nem egyeznek (független vizsgálatban N és/vagy P) (1. ábra). A további vizsgálatmenetek abban az esetben is pozitívnak minősülnek, ha a CD86 expressziója csak egyetlen nem citotoxikus koncentrációban éri el vagy haladja meg a 150 %-ot, mivel a koncentrációértékeket az adott vizsgálati vegyi anyagra igazították. A végső előrejelzés a három vagy négy független vizsgálatmenet többségi eredményén alapul (vagyis 3-ból 2 vagy négyből 2 eredményén) (1. ábra).

▼M8



1. ábra: Az U-SENS™ vizsgálatban alkalmazott előrejelzési modell. Az U-SENS™ vizsgálat előrejelzését integrált értékelési és vizsgálati megközelítés keretében, valamint a 4. pont és az Általános bevezetés 7., 8. és 9. pontjának rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni.

N: olyan vizsgálatmenet, amelyben nem figyeltek meg sem pozitív CD86 expressziót, sem interferenciát;

P: olyan vizsgálatmenet, amelyben pozitív CD86 expressziót és/vagy interferenciá(ka)t figyeltek meg;

NC: nem meggyőző. Az első vizsgálatmenet akkor minősül nem meggyőzőnek, ha a CD86 csak a legmagasabb nem citotoxikus koncentrációban pozitív.

#: amennyiben csak az első vizsgálatmenetet nem meggyőzőnek (NC) nyilvánítják, automatikusan szükség van egy harmadik vizsgálatmenetre is, hogy 3 független vizsgálatmenetből legalább 2-ben pozitív (P) vagy negatív (N) többséget lehessen elérni.

$: a keretek a három vizsgálatmenetből származó eredmények releváns kombinációit jelenítik meg az első két vizsgálatmenet fenti keretben látható eredményei alapján.

°: a keretek a négy vizsgálatmenetből származó eredmények releváns kombinációit jelenítik meg az első három vizsgálatmenet fenti keretben látható eredményei alapján.

Elfogadhatósági kritériumok

22. Az U-SENS™ vizsgálat alkalmazásakor az alábbi elfogadhatósági kritériumoknak kell teljesülniük (12).

— A 45 ±3 órás expozíciós időtartam végére a triplikátumban vizsgált kezeletlen U937 sejtek átlagos életképességének meg kell haladnia a 90 %-ot, és a CD86 expressziója nem tolódhat el. A kezeletlen U937 sejtek CD86 bazális expressziójának a legalább 2 % és legfeljebb 25 % közötti tartományban kell lennie.

▼M8

— Ha DMSO-t használnak oldószerként, a DMSO vivőanyagos kontroll érvényességét úgy mérik fel, hogy meghatározzák a DMSO kezeletlen sejtekhez viszonyított stimulációs indexét, ugyanakkor a triplikátumban vizsgált sejtek átlagos életképességének meg kell haladnia a 90 %-ot. A DMSO vivőanyagos kontroll akkor tekinthető érvényesnek, ha a triplikátumban vizsgált CD86 stimulációs indexének átlaga nem éri el a kezeletlen U937 sejtek triplikátumban vizsgált CD86 S.I. átlagának 250 %-át.

— A vizsgálatmenetek akkor minősülnek érvényesnek, ha a kezeletlen U937 sejtek három IgG1 értéke közül minimum kettő legalább 0,6 % és kisebb mint 1,5 %.

— A párhuzamosan vizsgált negatív kontroll (tejsav) akkor tekinthető érvényesnek, ha a három replikátumból legalább kettő negatív (CD86 S.I. < 150 %) és nem citotoxikus (sejtéletképesség ≥ 70 %).

— A pozitív kontroll (TNBS) akkor érvényes, ha a három replikátumból legalább kettő pozitív (CD86 S.I. ≥ 150 %) és nem citotoxikus (sejtéletképesség ≥ 70 %).

Vizsgálati jegyzőkönyv

23. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag

Egy összetevőből álló anyag

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— fizikai megjelenés, teljes tápoldatban való oldhatóság, DMSO-ban való oldhatóság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), tisztaságával, mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival (lásd fent) jellemezve; amennyiben rendelkezésre állnak;

— fizikai megjelenés, teljes tápoldatban való oldhatóság, DMSO-ban való oldhatóság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— molekulatömeg vagy látszólagos molekulatömeg ismert összetételű keverékek/polimerek esetén, vagy a vizsgálat lebonyolítása szempontjából releváns egyéb információ;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

▼**M8**

Kontrollok

Pozitív kontroll

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— fizikai megjelenés, DSMO-ban való oldhatóság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak és szükség szerint;

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— adott esetben hivatkozás a pozitív történeti kontrollok eredményeire, amelyek a vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumainak való megfelelőséget bizonyítják.

Negatív és oldószeres/vivőanyagos kontroll

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— fizikai megjelenés, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben a vizsgálati iránymutatásban említett kontroll oldószerektől/vivőanyagoktól eltérő oldószerek/vivőanyagok használatosak, és amennyiben rendelkezésre állnak;

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Vizsgálati körülmények

— a megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe;

— az alkalmazott vizsgálat leírása;

— használt sejtvonal, annak tárolási feltételei és eredete (például az a létesítmény, ahonnan beszerezték);

— az alkalmazott áramlási citometria rendszer (pl. modell) és annak műszerbeállításai, valamint az alkalmazott ellenanyagok és citotoxicitási markerek;

— a vizsgálat végrehajtásában való, a jártassági tesztanyagok vizsgálatával megszerzett laboratóriumi jártasság bizonyítására alkalmazott eljárás és a vizsgálat idővel reprodukálható teljesítményének bizonyítására alkalmazott eljárás, pl. a dokumentált kontrolladatok és/vagy a dokumentált reaktivitási vizsgálatok adatai.

A vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

— az oldószeres/vivőanyagos kontroll során kapott sejtéletképesség és CD86 stimulációs index az elfogadhatósági tartományokkal való összevetésben;

▼M8

— a pozitív kontroll során kapott sejtéletképesség és stimulációs index az elfogadható tartományokkal való összevetésben;

— a vizsgálati vegyi anyag minden vizsgált koncentrációjában mért sejtéletképesség.

A vizsgálat menete

— az alkalmazott vizsgálatmenetek száma;

— a vizsgálati vegyi anyag koncentrációi, alkalmazása és a használt expozíciós idő (ha eltér az ajánlottól);

— az expozíció időtartama;

— az alkalmazott értékelési és döntési kritériumok leírása;

— a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása.

Eredmények

— az egyes vizsgálatmenetekben a vizsgálati vegyi anyaggal és a pozitív kontrollal kapott eredmények táblázatba foglalása, feltüntetve a CV70 értéket (ha alkalmazandó), a stimulációs indexet, a sejtéletképességi értékeket, az EC_{150} értéket (ha alkalmazandó), valamint a vizsgálati vegyi anyag előrejelzési modell szerinti besorolását;

— adott esetben bármely más releváns észrevétel leírása.

Az eredmények tárgyalása

— az U-SENS™ vizsgálattal kapott eredmények tárgyalása;

— a vizsgálat eredményeinek integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő tárgyalása, amennyiben rendelkezésre állnak más releváns információk.

Következtetések

SZAKIRODALOM

(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. A dokumentum az alábbi helyről elérhető: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 10.2 787/8157 37. Elérhető a következő címen: [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 10.2 760/5889 55. Elérhető a következő címen: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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.

(8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

(9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.

(10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1 683-1 696.

(11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen:http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. A dokumentum az alábbi helyről elérhető: [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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: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. Elérhető a következő címen: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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: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. Elérhető a következő címen:https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

▼M8

2.1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálattal kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálat megfelelőségének mutatója, és relevanciájának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés” szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket (14).

Káros kimeneti út (Adverse Outcome Pathway, AOP): valamely megcélzott vegyi anyag vagy hasonló vegyi anyagok csoportjának kémiai szerkezetéből kiinduló, a molekuláris kiváltó eseményen keresztül az érintett in vivo eredményig végbemenő eseménysorozat (15).

CD86 koncentrációfüggő válasz: koncentrációfüggésről (vagy koncentráció válaszról) akkor lehet szó, amikor egy pozitív választ (CD86 S.I. ≥ 150) kiváltó koncentrációt követő koncentráció növeli a CD86 stimulációs indexét.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

CV70: 70 %-os sejtéletképességet eredményező becsült koncentráció.

Eltolódás: eltolódásnak nevezik azt, ha i) a kezeletlen kontroll 3. replikátumának kiigazított $CD86^+$ értéke nem éri el a kezeletlen kontroll 1. és 2. replikátumánál mért kiigazított $CD86^+$ értékek átlagának 50 %-át; és ha ii) a negatív kontroll 3. replikátumának kiigazított $CD86^+$ értéke nem éri el a negatív kontroll 1. és 2. replikátumánál mért kiigazított $CD86^+$ értékek átlagának 50 %-át.

EC150: a CD86 expressziója során 150 %-os stimulációs indexet eredményező becsült koncentrációk.

Áramlási citometria: citometrikus technika, amelyben a folyadékáramban szuszpendált sejtek egyenként áthaladnak egy fókuszált gerjesztő fénynyalábon, amely a sejtekre és összetevőire jellemző minták szerint szóródik szét; a sejteket gyakran fluoreszcens markerekkel jelölik meg, amelyek az abszorbeált fényt eltérő frekvenciákon bocsátják ki.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

Integrált vizsgálati és értékelési megközelítés: valamely vegyi anyag vagy vegyianyag-csoport veszélyeinek azonosításához (potenciál), jellemzéséhez (hatáserősség) és/vagy biztonsági értékeléséhez (potenciál, hatáserősség és expozíció) alkalmazott strukturált megközelítés, amely stratégiai szempontból beépít és mérlegel minden olyan releváns adatot, amely hozzájárul a lehetséges veszélyre és/vagy kockázatra és/vagy a további célirányos és ezért minimális vizsgálat szükségességére vonatkozó szabályozói döntéshozatalhoz.

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő legalább 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

▼M8

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Pre-haptének: abiotikus átalakulás, például oxidáció révén szenzibilizálóvá váló vegyi anyagok.

Pro-haptének: olyan vegyi anyagok, amelyek enzimatikus aktivációt igényelnek bőrszenzibilizáló hatásuk kifejtéséhez.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálat pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (14).

Megbízhatóság: a vizsgálat laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik (14).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollal és egy pozitív kontrollal.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (14).

S.I.: stimulációs index. A vegyi anyaggal kezelt sejteknél mért fluoreszcencia-intenzitás mértani középértékének az oldószerrel kezelt sejtekéhez viszonyított relatív értéke.

Oldószeres/vivőanyagos kontroll: valamely vizsgálati rendszernek a vizsgálati vegyi anyagon kívüli összes összetevőjét tartalmazó kezeletlen minta, amely azonban magában foglalja az alkalmazott oldószert/vivőanyagot. Az ugyanabban az oldószerben/vivőanyagban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyaggal kezelt minták esetében a kiindulási érték létrehozásához használatos. Párhuzamos tápoldatos kontrollal elvégzett vizsgálata esetén ez a minta azt is bizonyítja, hogy az oldószer/vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Specificitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (14).

Festő puffer: 5 % magzati borjú szérummal kiegészített foszfátpuffert tartalmazó sóoldat.

Anyag: olyan természetes állapotban előforduló vagy gyártási eljárásból származó kémiai elem és vegyületei, amely a stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagot és az alkalmazott eljárásból származó szennyező anyagokat is tartalmazhat, de nem tartalmaz olyan oldószert, amely az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltoztatása nélkül elkülöníthető.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálat alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

▼**M8**

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (16).

UVCB: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

Érvényes vizsgálat: olyan vizsgálat, amely kellően relevánsnak és megbízhatónak minősül egy adott célra, és amely tudományosan megalapozott elveken alapul. Egy-egy vizsgálat abszolút értelemben soha nem érvényes, kizárólag meghatározott céllal összefüggésben (14).

▼M8

2.2. függelék

JÁRTASSÁGI TESZTANYAGOK

A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak igazolniuk kell szakmai jártasságukat oly módon, hogy az 1. táblázatban javasolt 10 anyagra vonatkozóan az U-SENS™ vizsgálattal várható előrejelzést helyesen kapják meg, továbbá a 10 jártassági tesztanyag közül legalább 8 esetében referenciatartományba eső CV70 és EC150 értékeket kapnak. A jártassági tesztanyagok kiválasztása oly módon történt, hogy az a bőrszenzibilizáció veszélye esetén bekövetkező különféle válaszreakciók tartományát illetően reprezentatív legyen. A kiválasztás többi kritériuma az volt, hogy a vegyi anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, azokra vonatkozóan kiváló minőségű in vivo referenciaadatok álljanak rendelkezésre, és az U-SENS™ vizsgálat alapján kiváló minőségű in vitro adatok álljanak rendelkezésre. Az U-SENS™ vizsgálathoz rendelkezésre állnak publikált referenciaadatok is (1) (8).

1. táblázat

Az U-SENS™ vizsgálatban való szakmai jártasság bizonyításához ajánlott anyagok

Jártassági tesztanyagok	CAS-szám	Halmazállapot	In vivo előrejelzés [1]	U-SENS Oldószer/vivőanyag	U-SENS CV70 referencia-tartomány µg/ml-ben [2]	U-SENS EC150 referencia-tartomány µg/ml-ben [2]
4-Fenilén-diamin	106-50-3	Szilárd	Szenzibilizáló (erősen)	Teljes tápoldat [3]	< 30	Pozitív (≤ 10)
Pikril-szulfonsav	2508-19-2	Folyadék	Szenzibilizáló (erősen)	Teljes tápoldat	> 50	Pozitív (≤ 50)
Dietil-maleát	141-05-9	Folyadék	Szenzibilizáló (mérsékelten)	DMSO	10–100	Pozitív (≤ 20)
Rezorcin	108-46-3	Szilárd	Szenzibilizáló (mérsékelten)	Teljes tápoldat	> 100	Pozitív (≤ 50)
Cinnamil-alkohol	104-54-1	Szilárd	Szenzibilizáló (enyhén)	DMSO	> 100	Pozitív (10–100)
4-Allil-anisol	140-67-0	Folyadék	Szenzibilizáló (enyhén)	DMSO	> 100	Pozitív (< 200)
Szaharin	81-07-2	Szilárd	Nem szenzibilizáló	DMSO	> 200	Negatív (> 200)
Glicerin	56-81-5	Folyadék	Nem szenzibilizáló	Teljes tápoldat	> 200	Negatív (> 200)
Tejsav	50-21-5	Folyadék	Nem szenzibilizáló	Teljes tápoldat	> 200	Negatív (> 200)
Szalicilsav	69-72-7	Szilárd	Nem szenzibilizáló	DMSO	> 200	Negatív (> 200)

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám.

([1]) Az in vivo veszélyekre (és a hatáserősségre) vonatkozó előrejelzés LLNA-adatokon alapul (1) (8). Az in vivo hatáserősség levezetése az ECETOC által javasolt kritériumok segítségével történik (17).

([2]) A megfigyelt dokumentált értékek alapján (1) (8).

([3]) Teljes tápoldat: 10 % magzati borjú szérummal, 2 mM L-glutaminnal, 100 egység/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomicinnel kiegészített RPMI-1640 tápoldat (8).

▼M8

3. függelék

IN VITRO BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: IL-8 LUC VIZSGÁLAT

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

1. A sejtfelületi markerek kifejeződését elemző vizsgálatokkal ellentétben az IL-8 Luc vizsgálat egy citokin, az IL-8 dendritikus sejtek aktivációja általi expressziójában előidézett változásokat számszerűsíti. A THP-1 sejtekből származó IL-8 riporter sejtvonalat (THP-G8, amelyet a THP-1 humán monocita akut leukémia sejtvonalból hoztak létre) szenzibilizáló anyagokkal kezelik, majd megmérik az IL-8 kifejeződését (1). Ezt követően a luciferáz kifejeződését felhasználják a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetésének alátámasztására.

2. Az IL-8 Luc vizsgálatot értékelték egy, az Alternatív Módszerek Validálásával Foglalkozó Japán Központ (JaCVAM), a **Gazdasági, Kereskedelmi és Ipari Minisztérium** (METI) és a japán **állatkísérletek alternatív módszereivel foglalkozó társaság (JSAAE)** irányításával végzett validálási tanulmányban (2), amelyet később a JaCVAM és az Egészségügyi, Munkaügyi és Népjóléti Minisztérium (MHLW) égisze alatt, valamint az **alternatív vizsgálati módszerekre vonatkozó nemzetközi együttműködési keret** (ICATM) támogatásával független szakértői értékelésnek vetettek alá (3). A rendelkezésre álló bizonyítékok, valamint a szabályozó hatóságok és az érdekeltek álláspontja alapján az IL-8 Luc vizsgálat egy integrált vizsgálati és értékelési megközelítés részeként hasznosan alkalmazható a bőrszenzibilizáló és nem szenzibilizáló anyagok veszélyességi osztályozás és címkézés céljából történő megkülönböztetésére. Az IL-8 Luc vizsgálatból származó adatok és más információk együttes használatára fellelhetők példák a szakirodalomban (4) (5) (6).

3. Az IL-8 Luc vizsgálatról bebizonyosodott, hogy áthelyezhető a sejttenyésztés és a luciferáz mérése területén tapasztalattal rendelkező laboratóriumokba. A laboratóriumon belüli reprodukálhatóság 87,7 %, a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság pedig 87,5 % (2). A validálási tanulmányból (2) és más közzétett munkákból (1) (6) származó adatok azt jelzik, hogy az LLNA vizsgálati módszerhez képest az IL-8 Luc vizsgálat 143 vegyi anyagból 118-at minősített pozitívnak vagy negatívnak, és 25-öt nem meggyőzőnek, valamint hogy az IL-8 Luc vizsgálat a bőrszenzibilizáló (azaz az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1. kategóriába tartozó) anyagokat 86 %-os (101/118) pontossággal különbözteti meg a nem szenzibilizáló (vagyis az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerint nem besorolt) anyagoktól, 96 % az érzékenysége (92/96), a specifikussága pedig 41 % (9/22). A vizsgálat alábbiakban (az 5. pontban) ismertetett alkalmazási körén kívül eső anyagok kizárása esetén az IL-8 Luc vizsgálat 136 vegyi anyagból 113-at minősített pozitívnak vagy negatívnak, és 23 vegyi anyagot nem meggyőzőnek, így az IL-8 Luc vizsgálat pontossága 89 % (101/113), 96 % az érzékenysége (92/96), míg a specifikussága 53 % (9/17). Az Urbisch és munkatársai (7) által idézett humán adatok felhasználása alapján az IL-8 Luc vizsgálat 90 vegyi anyagból 76-ot minősített pozitívnak vagy negatívnak, és 14 vegyi anyagot nem meggyőzőnek, így pontossága 80 % (61/76), érzékenysége 93 % (54/58), míg a specifikussága 39 % (7/18). A vizsgálat alkalmazási körén kívül eső anyagok kizárása esetén az IL-8 Luc vizsgálat 84 vegyi anyagból 71-et minősített pozitívnak vagy negatívnak, és 13-at nem meggyőzőnek, így pontossága 86 % (61/71), érzékenysége 93 % (54/58), specifikussága pedig 54 % (7/13). Az IL-8 Luc vizsgálat nagyobb valószínűséggel vezet hamis negatív előrejelzésekhez olyan vegyi anyagoknál, amelyeknek alacsony/mérsékelt a bőrszenzibilizáló hatása (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1B. alkategóriába tartozó anyagoknál), mint a rendkívül bőrszenzibilizáló hatást mutató (az ENSZ-GHS/CLP-rendelet szerinti 1A. alkategóriába tartozó) anyagoknál (6). Ezek az információk összességében azt jelzik, hogy az IL-8 Luc vizsgálat érdemben hozzájárul a bőrszenzibilizáció veszélyének azonosításához. Az IL-8 Luc vizsgálat mint önálló vizsgálat esetében

▼M8

megadott pontossági értékek csak irányadóak, ugyanis a vizsgálatot az integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében más információforrásokkal együtt és az Általános bevezetés 7. és 8. pontjának rendelkezéseivel összhangban kell figyelembe venni. Ezen túlmenően a bőrszenzibilizáció nem állatokon alkalmazott vizsgálatainak értékelésekor nem szabad megfeledkezni arról, hogy az LLNA vizsgálat és más állatkísérletek nem feltétlenül tükrözik teljes egészében az embernél fennálló helyzetet.

4. Az aktuálisan rendelkezésre álló adatok alapján az IL-8 Luc vizsgálatról bebizonyosodott, hogy különféle szerves funkciós csoportokat, reakciómechanizmusokat, (in vivo vizsgálatok során meghatározott) bőrszenzibilizáló hatásokat és fizikai-kémiai tulajdonságokat képviselő vizsgálati vegyi anyagokra alkalmazható (2) (6).

5. Bár az IL-8 Luc vizsgálat során használt oldószer az X-VIVO™ 15, a vizsgálat megfelelően értékelte a 3,5-nél magasabb Log K_{ow} értékkel és 100 μg/ml körüli vízoldékonysággal rendelkező vegyi anyagokat (az EPI Suite™ számításai szerint), és a vízben nehezen oldódó szenzibilizáló anyagokat jobb hatékonysággal detektálja, mint az oldószerként dimetil-szulfoxidot (DMSO) alkalmazó IL-8 Luc vizsgálat (2). Azonban az oldószer 20 mg/ml koncentrációjában nem oldódó vizsgálati vegyi anyagok hamis negatív eredményhez vezethetnek, mivel nem oldhatók X-VIVO™ 15-ben. Ezért az ilyen vegyi anyagok negatív eredményeit figyelmen kívül kell hagyni. Az anhidridek esetében a validációs tanulmány magas hamisnegatív-arányt mutatott ki. Ezen túlmenően a sejtvonal korlátozott metabolikus képessége (8) és a kísérleti körülmények miatt a pro-haptének (metabolikus aktiválást igénylő vegyi anyagok) és a pre-haptének (a levegő oxidáló hatására aktiválódó anyagok) is negatív eredményre vezethetnek a vizsgálat során. Bár a feltételezhető pre-/pro-haptének negatív eredményét elővigyázatosan kell kezelni, az IL-8 Luc vizsgálat az adatbázisában szereplő 11 pre-hapténból 11-et, a 6 pro-hapténból 6-ot és a 8 pre-/pro-hapténból 6-ot helyesen sorolt be (2). A három nem állatokon alkalmazott, pre- és pro-hapténokat észlelni képes vizsgálat (a DPRA, a KeratinoSens™ és a h-CLAT) közelmúltbeli átfogó felülvizsgálata alapján (9), és figyelembe véve, hogy az IL-8 Luc vizsgálatban használt THP-G8 sejtek a h-CLAT vizsgálatban alkalmazott THP-1 sejtekből származnak, az IL-8 Luc vizsgálat más vizsgálatokkal való együttes alkalmazása esetén hozzájárulhat ahhoz, hogy növekedjen a nem állatokon alkalmazott vizsgálatok érzékenysége a pre- és pro-haptének detektálása terén. Az ez idáig vizsgált felületaktív anyagok típusuktól (pl. kationos, anionos vagy nem ionos) függetlenül (hamis) pozitív eredményekhez vezetnek. Végezetül a luciferázzal kölcsönhatásba lépő vegyi anyagok megzavarhatják a luciferáz aktivitását/mérését, látszólagos gátlást vagy megnövekedett lumineszcenciát okozva (10). Beszámoltak például arról, hogy az 1 μM-nél magasabb fitoösztrogén-koncentráció a luciferáz riportergén túlzott aktiválása miatt zavarja a lumineszcencia jeleit más, luciferáz alapú riportergén-vizsgálatokban. Következésképp a magas fitoösztrogén-koncentráció mellett vagy feltehetőleg a luciferáz riportergént a fitoösztrogénhez hasonló mértékben aktiváló vegyületek magas koncentrációja mellett kapott luciferáz-expressziót körültekintően meg kell vizsgálni (11). A fentiek fényében a felületaktív anyagok, az anhidridek és a luciferáz aktivitását zavaró vegyi anyagok kívül esnek a vizsgálat alkalmazási körén. Olyan esetekben, amikor bizonyítékkal igazolható, hogy az IL-8 Luc vizsgálat nem alkalmazható más, konkrét vegyianyag-kategóriákra, a vizsgálatot nem szabad e vegyianyag-kategóriákra alkalmazni.

6. A fentieknek megfelelően az IL-8 Luc vizsgálat elősegíti a bőrszenzibilizáló és a nem szenzibilizáló anyagok megkülönböztetését. Szükség van további, lehetőleg humán adatokon alapuló kutatásra annak meghatározása érdekében, hogy az IL-8 Luc vizsgálat eredményei – más információforrásokkal együtt mérlegelve – hozzájárulhatnak-e a hatáserősség értékeléséhez.

▼M8

7. A fogalommeghatározások a 3.1. függelékben találhatók.

A VIZSGÁLAT ELVE

8. Az IL-8 Luc vizsgálat THP-1 humán monocita leukémia sejtvonalat alkalmaz, amely az amerikai típustörzsanyag-gyűjteményből szerezhető be (Manassas, VA, USA). Ezt a sejtvonalat felhasználva a Tohokui Egyetem Orvostudományi Karának Bőrgyógyászati Tanszéke létrehozott egy THP-1 származék IL-8 riporter sejtvonalat, a THP-G8-at, amely IL-8 promóterrel szabályozott stabil narancssárga luciferáz (SLO) luciferáz gént és gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) promóterrel szabályozott stabil vörös luciferáz (SLR) luciferáz gént hordoz (1). Ez lehetővé teszi a luciferázgén-indukció kvantitatív mérését, mégpedig az IL-8 és a GAPDH szenzibilizáló vegyi anyagokkal való kezelést követő, sejteken belüli aktivitásának mutatójaként szolgáló – jól bevált fénytermelő luciferáz szubsztrátok által kibocsátott – lumineszcencia észlelése révén.

9. A két színt detektáló vizsgálati rendszer magában foglal egy narancssárga fényt kibocsátó luciferázt (SLO; λmax = 580 nm) (12), amely az IL-8 promóterrel szabályozott génkifejeződést jelzi, és egy vörös fényt kibocsátó luciferázt (SLR; λmax = 630 nm) (13), amely a belső szabályozó promóterrel, a GAPDH-val szabályozott génkifejeződést jelzi. A két luciferáz a d-luciferinnel reakcióba lépve eltérő színt bocsát ki; lumineszcenciájukat egyidejűleg, egylépéses reakció keretében mérik úgy, hogy optikai szűrő használatával elkülönítik a kibocsátást a vizsgálati keveréktől (14) (3.2. függelék).

10. A THP-G8 sejteket 16 órán át kezelik a vizsgálati vegyi anyaggal, majd megmérik az IL-8 promóter aktivitását tükröző SLO luciferázaktivitást (SLO-LA) és a GAPDH promóter aktivitását tükröző SLR luciferázaktivitást (SLR-LA). A rövidítések értelmezésének megkönnyítése érdekében az SLO-LA a továbbiakban IL8LA, az SLR-LA pedig GAPLA néven szerepel. Az 1. táblázat ismerteti az IL-8 Luc vizsgálatban mért luciferázaktivitással kapcsolatos kifejezések leírását. A mért értékek alapján meghatározzák az IL8LA normalizált értékét (nIL8LA), amely az IL8LA és a GAPLA hányadosa; az nIL8LA indukcióját (Ind-IL8LA), amely a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt THP-G8 sejtek négyszeresen mért nIL8LA értéke számtani átlagának a kezeletlen THP-G8 sejtek nIL8LA értékeinek számtani átlagához viszonyított aránya; és a GAPLA gátlását (Inh-GAPLA), amely a vizsgálati vegyi anyaggal kezelt THP-G8 sejtek négyszeresen mért GAPLA értéke számtani átlagának a kezeletlen THP-G8 sejtek GAPLA értékeinek számtani átlagához viszonyított aránya, és amely a citotoxicitás mutatója.

1. táblázat

Az IL-8 Luc vizsgálatban mért luciferázaktivitással kapcsolatos kifejezések leírása

Rövidítések	Fogalommeghatározás
GAPLA	A GAPDH promóter aktivitását tükröző SLR luciferázaktivitás
IL8LA	Az IL-8 promóter aktivitását tükröző SLO luciferázaktivitás
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	A vegyi anyagokkal kezelt THP-G8 sejtek nIL8LA értéke/kezeletlen sejtek nIL8LA értéke

▼M8

Rövidítések	Fogalommeghatározás
Inh-GAPLA	A vegyi anyagokkal kezelt THP-G8 sejtek GAPLA értéke/kezeletlen sejtek GAPLA értéke
CV05	A vegyi anyag azon legalacsonyabb koncentrációja, amely 0,05 alatti Inh-GAPLA értéket idéz elő.

11. Az IL-8 Luc vizsgálathoz hasonló in vitro IL-8 luciferáz vizsgálatok validálásának megkönnyítéséhez rendelkezésre állnak teljesítményszabványok (15), amelyek lehetővé teszik az OECD 442E vizsgálati iránymutatásának időben történő módosítását az IL-8 luciferáz vizsgálatok e vizsgálati iránymutatásba való beépítéséhez. Az adatok OECD-megállapodás szerinti kölcsönös elfogadása csak a teljesítményszabványoknak megfelelően validált vizsgálatok esetében lesz garantált, ha e vizsgálatokat az OECD felülvizsgálta és belefoglalta 442E vizsgálati iránymutatásába (16).

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

12. A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak a 3.3. függelékben felsorolt tíz jártassági tesztanyag in vitro módszerekre vonatkozó bevált gyakorlatokkal összhangban történő vizsgálatával igazolniuk kell szakmai jártasságukat (17). Ezenfelül a vizsgálat felhasználóinak történeti adatbázist kell fenntartaniuk, amely tartalmazza a reaktivitási tesztekből (lásd a 15. pontot), valamint a pozitív és az oldószeres/vivőanyagos kontrollokból (lásd a 21–24. pontot) származó adatokat, ezekkel az adatokkal igazolva a vizsgálat laboratóriumon belüli hosszú távú reprodukálhatóságát.

ELJÁRÁS

13. Az IL-8 Luc vizsgálathoz rendelkezésre állnak szabványműveleti eljárások, amelyeket alkalmazni kell e vizsgálat végrehajtása során (18). A vizsgálat elvégzésére vállalkozó laboratóriumok a rekombináns THP-G8 sejtvonalat az OECD sablonban szereplő feltételeknek megfelelően egy anyagátadási megállapodás aláírását követően a GPC Lab. Co. Ltd. vállalattól (Tottori, Japán) szerezhetik be. A következő pontok ismertetik a vizsgálat főbb összetevőit és eljárásait.

Sejtek előkészítése

14. Az IL-8 Luc vizsgálathoz THP-G8 sejtvonalat kell használni, amely a GPC Lab. Co. Ltd. vállalattól (Tottori, Japán) szerezhető be (lásd a 8. és a 13. pontot). A sejteket a beérkezésüket követően (2–4 passzálással) fel kell szaporítani, és homogén állományként fagyasztva kell tárolni. Az ebből az állományból származó sejteket legfeljebb 12 passzálás erejéig vagy legfeljebb 6 héten át lehet szaporítani. A szaporításhoz használt közeg az RPMI-1640 tápfolyadék, kiegészítve 10 % magzati borjú szérummal (FBS), antibiotikumos/antimikotikus oldattal (100 egység/ml penicillin g, 100 μg/ml sztreptomicin és 0,25 μg/ml amfotericin B 0,85 %-os sóoldatban) (pl. GIBCO, kat.száma: 15240-062), 0,15 μg/ml puromicinnel (CAS-száma: 58-58-2) és 300 μg/ml G418-cal (CAS-száma: 108321-42-2).

15. A vizsgálatban való felhasználásuk előtt a sejteket egy reaktivitási teszt során minősíteni kell. A reaktivitási tesztet a felolvasztás után 1–2 héttel vagy 2–4 passzálást követően kell elvégezni, a pozitív kontrollanyaggal, vagyis a 4-nitrobenzil-bromiddal (4-NBB) (CAS-száma: 100-11-8, legalább 99 %-os tisztaságban) és a negatív kontrollanyaggal, a tejsavval (LA) (CAS-száma: 50-21-5, legalább 85 % tisztaságban). A 4-NBB-nak pozitív választ (legalább 1,4-es Ind-IL8LA), a tejsavnak pedig negatív választ (1,4-nél kisebb Ind-IL8LA) kell kiváltania. A vizsgálathoz kizárólag a reaktivitási tesztben megfelelt sejtek használhatók. A tesztet a 22–24. pontban leírt eljárások szerint kell végrehajtani.

▼M8

16. A vizsgálathoz a THP-G8 sejteket 2–5 × 10^5 sejt/ml sűrűségben átoltják, majd sejttenyésztő lombikban 48–96 órán keresztül előtenyésztik. A vizsgálat napján a sejttenyésztő lombikból begyűjtött sejteket 10 % FBS-t tartalmazó, antibiotikum-mentes RPMI-1640 tápoldatban átmossák, majd 10 % FBS-t tartalmazó, antibiotikum-mentes RPMI-1640 tápoldatban 1 × 10^6 sejt/ml sűrűségben újraszuszpendálják. Ezt követően a sejteket 50 µl mennyiségben (lyukanként 5 × 10^4 sejt sűrűségben) elhelyezik egy 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemezben (pl. Costar, kat.száma: 3603).

A vizsgálati vegyi anyag és a kontrollanyagok előkészítése

17. A vizsgálati vegyi anyagot és a kontrollanyagokat a vizsgálat napján kell előkészíteni. Az IL-8 Luc vizsgálatban a vizsgálati vegyi anyagokat X-VIVO™ 15-ben, egy kereskedelmi forgalomban kapható, szérummentes tápoldatban (Lonza, 04-418Q) oldják fel, 20 mg/ml végső koncentrációban. Egy mikrocentrifuga csőbe töltött 20 mg vizsgálati vegyi anyaghoz (a vegyi anyag oldhatóságától függetlenül) hozzáadnak annyi X-VIVO™ 15 tápoldatot, hogy a keverék térfogata 1 ml legyen, majd a keveréket 30 percig, körülbelül 20 °C-os környezeti hőmérsékleten intenzív örvénykeverésnek vetik alá és rotorral legfeljebb 8 rpm sebességen rázatják. Amennyiben a szilárd vegyi anyagok ilyen módon nem oldódnak fel, a csövet ultrahanggal kezelik mindaddig, amíg a vegyi anyag teljesen feloldódik vagy stabilan diszpergálódik. Az X-VIVO™ 15 tápoldatban oldható vizsgálati vegyi anyagok esetében az oldatot X-VIVO™ 15-ben 5-szörös tényezővel hígítják, és a kapott keveréket a vizsgálati vegyi anyag X-VIVO™ 15 (4 mg/ml-os) törzsoldataként hasznosítják. Az X-VIVO™ 15 tápoldatban nem oldható vizsgálati vegyi anyagok esetében a keveréket ismét legalább 30 percig rázatják, majd 5 percen keresztül 15000 rpm (≈20000 *g*) sebességen centrifugálják; a létrejött felülúszót a vizsgálati vegyi anyag X-VIVO™ 15 törzsoldataként hasznosítják. Más oldószerek, például DMSO, víz vagy a tápfolyadék használatát tudományosan meg kell indokolni. A vegyi anyagok feloldásának részletes eljárását a 3.5. függelék ismerteti. A 18–23. pontban leírtak szerint elkészített X-VIVO™ 15 oldatokat 1: 1 térfogatszázalék arányban össze kell keverni a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemezen elkészített sejtszuszpenziókkal (lásd a 16. pontot).

18. Az első vizsgálatmenet célja a citotoxikus koncentráció meghatározása és a vegyi anyagok bőrszenzibilizáló potenciáljának felmérése. A vizsgálati vegyi anyagok X-VIVO™ 15 törzsoldataiból X-VIVO™ 15 tápoldattal, kétszeres hígítási tényezővel oldatsorozatot készítenek (lásd a 3.5. függeléket) egy 96 lyukú vizsgálati lemezen (pl. Costar, kat.száma: EW-01729-03). Ezután lyukanként 50 µl mennyiségű hígított oldatot adagolnak a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemezen elkészített 50 µl mennyiségű sejtszuszpenziókhoz. Tehát az X-VIVO ™ 15-ben oldható vizsgálati vegyi anyagok esetében a vizsgálati vegyi anyagok végső koncentrációértékei a 0,002–2 mg/ml-es tartományban helyezkednek el (3.5. függelék). A 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO ™ 15-ben nem oldható vizsgálati vegyi anyagoknál csak a 2 és 2^{10} közötti hígítási tényező határozható meg, a vizsgálati vegyi anyagok tényleges végső koncentrációértékei bizonytalanok, mivel attól függnek, hogy a vizsgálati vegyi anyagoknak mekkora a telítési koncentrációja az X-VIVO ™ 15 törzsoldatban.

19. A további vizsgálatmenetekben (vagyis a második, harmadik és negyedik ismétlésben) az X-VIVO™ 15 törzsoldat koncentrációja négyszerese annak a koncentrációértéknek, amely az első kísérlet során 05-ös sejtéletképességet eredményezett (CV05; az a legalacsonyabb koncentráció, amely 0,05 alatti Inh-GAPLA értéket idéz elő). Amennyiben az első vizsgálatmenetben alkalmazott legmagasabb koncentrációnál az Inh-GAPLA nem süllyed 0,05 alá, az X-VIVO™ 15 törzsoldatát az első vizsgálatmenet legmagasabb koncentrációjában készítik el. A CV05 értéket eredményező koncentráció kiszámításához elosztják az első vizsgálatmenet törzsoldatának koncentrációját a CV05 hígítási tényezővel (X) (CV05 hígítási tényező (X); az a hígítási tényező, amellyel a törzsoldat CV05 értéket eredményező koncentrációra hígítható) (lásd a 3.5. függeléket). A 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO-ban nem oldható vizsgálati anyagoknál a CV05 meghatározásához a törzsoldat koncentrációját megszorozzák 1/X-szel. A 2–4. vizsgálatmenethez egy második törzsoldatot készítenek, 4 × CV05 koncentrációban (3.5. függelék).

▼**M8**

20. Az X-VIVO™ 15 második törzsoldatából 1,5-szörös hígítási tényezővel készítenek oldatsorozatot, egy 96 lyukú vizsgálati lemezen. Ezután lyukanként 50 µl mennyiségű hígított oldatot adagolnak a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemez lyukaiba helyezett 50 µl mennyiségű sejtszuszpenziókhoz. Minden vizsgálati vegyi anyag valamennyi koncentrációját 4 lyukban vizsgálják. Ezt követően a mintákat lemezrázón összekeverik, és 16 órán át inkubálják 37 °C-on, 5 % CO_2 mellett, majd az alább leírt módon megmérik a luciferázaktivitást.

21. Az oldószeres kontroll a lyukanként 50 µl X-VIVO™ 15 és a lyukanként 50 µl, 10 % FBS-t tartalmazó RPMI-1640 tápoldatban lévő sejtszuszpenzió keveréke.

22. Az ajánlott pozitív kontroll a 4-NBB. Egy 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőben elhelyeznek 20 mg 4-NBB-t, majd hozzáadnak annyi X-VIVO™ 15-öt, hogy a keverék térfogata 1 ml legyen. A csövet legalább 30 percig intenzív örvénykeverésnek vetik alá és rotorral legfeljebb 8 rpm sebességen rázatják. Ezt követően a keveréket 5 percig 20000 g-n centrifugálják, majd a felülúszót 4-szeres tényezővel X-VIVO™ 15-tel hígítják, és 500 µl hígított felülúszót áthelyeznek a 96 lyukú vizsgálati lemez egyik lyukába. A hígított felülúszót 2-szeres és 4-szeres tényezővel tovább hígítják X-VIVO™ 15-tel, majd 50 µl mennyiségű oldatot adagolnak a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemez lyukaiba helyezett 50 µl mennyiségű THP-G8 sejtszuszpenziókhoz (3.6. függelék). A pozitív kontroll valamennyi koncentrációját 4 lyukban vizsgálják. A lemez tartalmát lemezrázón összekeverik, és CO_2 inkubátorban 16 órán át inkubálják (37 °C-on, 5 % CO_2 mellett), majd a 29. pontban leírt módon megmérik a luciferázaktivitást.

23. Az ajánlott negatív kontrollanyag a tejsav. Egy 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőben elhelyeznek 20 mg tejsavat, majd hozzáadnak annyi X-VIVO™ 15-öt, hogy a keverék térfogata 1 ml legyen (20 mg/ml). A 20 mg/ml koncentrációjú tejsavoldatot 5-szörös tényezővel X-VIVO™ 15-tel hígítják (4 mg/ml); majd a 4 mg/ml koncentrációjú tejsavoldatból 500 µl mennyiséget áthelyeznek a 96 lyukú vizsgálati lemez egyik lyukába. Ezt az oldatot 2-szeres tényezővel X-VIVO™ 15-tel hígítják, majd ismét 2-szeres tényezővel tovább hígítják, 2 mg/ml-es és 1 mg/ml-es oldatokat hozva létre. E 3 oldatból és a vivőanyagos kontrollból (X-VIVO™ 15) 50 µl mennyiséget adagolnak a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemez lyukaiba helyezett 50 µl mennyiségű THP-G8 sejtszuszpenziókhoz. A negatív kontroll valamennyi koncentrációját 4 lyukban vizsgálják. A lemez tartalmát lemezrázón összekeverik, és CO_2 inkubátorban 16 órán át inkubálják (37 °C-on, 5 % CO_2 mellett), majd a 29. pontban leírt módon megmérik a luciferázaktivitást.

24. Alkalmazhatók más, megfelelő pozitív vagy negatív kontrollok is, ha rendelkezésre állnak dokumentált adatok hasonló vizsgálatmenet-elfogadhatósági kritériumok származtatásához.

25. Ügyelni kell az illékony vizsgálati vegyi anyagok elpárolgásának elkerülésére, valamint a lyukak vizsgálati vegyi anyagokkal való keresztszennyeződésének elkerülésére, például a lemezek befedhetők fóliával a vizsgálati vegyi anyagokkal való inkubálás előtt.

26. A vizsgálati vegyi anyagokat és az oldószeres kontrollt 2–4 vizsgálatmenetben kell vizsgálni ahhoz, hogy meg lehessen állapítani a besorolás pozitív vagy negatív előrejelzését (lásd a 2. táblázatot). Mindegyik vizsgálatmenetet más-más napon, a vizsgálati vegyi anyaggal frissen készített X-VIVO™ 15 törzsoldattal és egymástól függetlenül begyűjtött sejtekkel kell elvégezni. A sejtek származhatnak ugyanabból a passzálásból.

▼M8

A luciferáz-aktivitás mérése

27. A lumineszcenciát 96 lyukú mikrolemezhez való luminométerrel mérik, amelyet optikai szűrőkkel szerelnek fel, pl. Phelios (ATTO, Tokió, Japán), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Németország) és az ARVO sorozat (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). A reprodukálhatóság biztosítása érdekében a luminométert minden vizsgálat előtt kalibrálni kell (19). A kalibráláshoz rendelkezésre állnak rekombináns, narancssárga és vörös fényt kibocsátó luciferázok.

28. A lemez valamennyi vegyi anyaggal kezelt vagy kezeletlen sejtszuszpenziót tartalmazó lyukába helyeznek 100 µl felmelegített Tripluc® luciferáz vizsgálati reagenst (Tripluc). A lemezt körülbelül 20 °C-os környezeti hőmérsékleten 10 percig rázatják. Ezután a lemezt a luciferáz-aktivitás méréséhez a luminométerbe helyezik. A biolumineszcenciát 3 másodpercig mérik optikai szűrő nélkül (F0) és optikai szűrővel (F1). Ha például a használt luminométer típusa miatt ettől eltérő beállításokat alkalmaznak, azt tudományosan indokolni kell.

29. A mért értékek alapján meghatározzák az egyes koncentrációk paramétereit, például az IL8LA, a GAPLA, az nIL8LA, az Ind-IL8LA, az Inh-GAPLA értékét, az IL8LA átlagát ±SD, a GAPLA átlagát ±SD, az nIL8LA átlagát ±SD, az Ind-IL8LA átlagát ±SD, az Inh-GAPLA átlagát ±SD és az Ind-IL8LA 95 %-os konfidenciaintervallumát. Az ebben a pontban említett paraméterek meghatározását a 3.1. és a 3.4. függelék tartalmazza.

30. A mérés előtt a több színt észlelő riporter vizsgálatokban a színek elkülönítését általában optikai szűrővel – például sharp-cut (long-pass vagy short-pass) szűrővel vagy sávszűrővel – felszerelt detektorokkal (luminométerrel és lemezolvasóval) végzik. Az egyes bioluminescens jelzőszínek kiszűréséhez használt szűrők transzmissziós koefficiensét a vizsgálatot megelőzően a 3.2. függelékben foglaltak szerint kalibrálni kell.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Az adatok kiértékelése

31. A pozitív/negatív döntés kritériumai alapján minden vizsgálatmenetre érvényesek az alábbiak:

— az IL-8 Luc vizsgálat előrejelzése akkor pozitív, ha az Ind-IL8LA legalább 1,4 és az Ind-IL8LA 95 %-os konfidenciaintervallumának alsó határértéke legalább 1,0;

— az IL-8 Luc vizsgálat előrejelzése akkor negatív, ha az Ind-IL8LA kisebb mint 1,4 és/vagy az Ind-IL8LA 95 %-os konfidenciaintervallumának alsó határértéke kisebb mint 1,0.

Előrejelzési modell

32. Azok a vizsgálati vegyi anyagok, amelyek az 1., 2., 3. és 4. vizsgálatmenetben két pozitív eredményre vezettek, pozitívnak minősülnek, míg azok, amelyek az 1., 2., 3. és 4. vizsgálatmenetben három negatív eredményre vezettek, feltételezett negatívnak tekintendők (2. táblázat). A feltételezett negatív vegyi anyagok közöl azok, amelyek oldódnak 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO™ 15-ben, negatívnak tekintendők, azok a vegyi anyagok pedig, amelyek nem oldódnak 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO™ 15-ben, nem minősíthetők (1. ábra).

▼M8

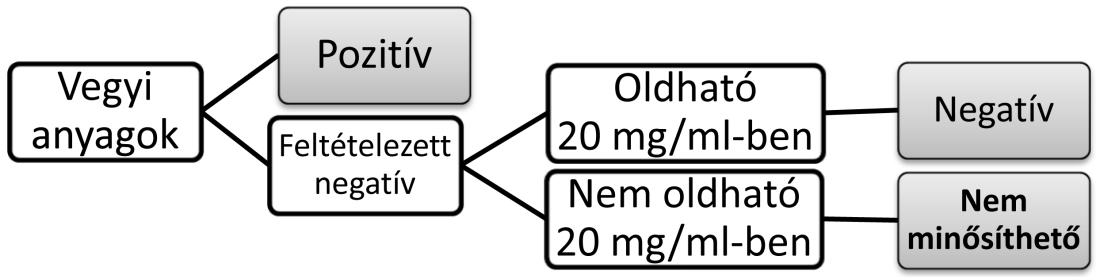
2. táblázat

A pozitív és a feltételezett negatív anyagok azonosításának kritériumai

1. vizsgálatmenet	2. vizsgálatmenet	3. vizsgálatmenet	4. vizsgálatmenet	Végső előrejelzés
Pozitív	Pozitív	—	—	Pozitív
	Negatív	Pozitív	—	Pozitív
		Negatív	Pozitív	Pozitív
			Negatív	Feltételezett negatív
Negatív	Pozitív	Pozitív	—	Pozitív
		Negatív	Pozitív	Pozitív
			Negatív	Feltételezett negatív
	Negatív	Pozitív	Pozitív	Pozitív
			Negatív	Feltételezett negatív
		Negatív	—	Feltételezett negatív

1. ábra

A végső döntés előrejelzési modellje



Elfogadhatósági kritériumok

33. Az IL-8 Luc vizsgálat alkalmazásakor az alábbi elfogadhatósági kritériumoknak kell teljesülniük.

— Az Ind-IL8LA értékének minden vizsgálatmenetben a pozitív kontrollanyag, a 4-NBB legalább egyik koncentrációjában nagyobbnak kell lennie mint 5,0.

— Az Ind-IL8LA értékének minden vizsgálatmenetben a negatív kontrollanyag, a tejsav minden koncentrációjában kisebbnek kell lennie mint 1,4.

— Azon lemezek adatait, amelyeknél a sejteket és Tripluc reagenst tartalmazó, de vegyi anyag nélküli, kontrollként szolgáló lyukak GAPLA értéke nem éri el a csak a vizsgálati tápoldatot (vagyis lyukanként 50 µl, 10 % FBS-sel kiegészített RPMI-1640 és lyukanként 50 µl X-VIVO™ 15 keverékét) tartalmazó lyuk GAPLA értékének 5-szörösét, nem szabad figyelembe venni.

— Szintén nem vehetők figyelembe azon lemezek adatai, amelyeknél a vizsgálati vagy kontrollként szolgáló vegyi anyagok összes koncentrációjánál az Inh-GAPLA kevesebb mint 0,05. Ez utóbbi esetben az első vizsgálatot meg kell ismételni, méghozzá úgy, hogy az ismétlésben alkalmazott legmagasabb végső koncentráció az előző vizsgálat legalacsonyabb végső koncentrációja legyen.

▼M8

Vizsgálati jegyzőkönyv

34. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyagok

Egy összetevőből álló anyag:

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— oldhatóság X-VIVO™ 15-ben. Az X-VIVO™ 15-ben oldhatatlan vegyi anyagok esetében: a centrifugálást követően megfigyeltek-e kicsapódást vagy flotációt;

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— nem X-VIVO™ 15 használata esetén az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), tisztaságával, mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival (lásd fent) jellemezve; amennyiben rendelkezésre állnak;

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak;

— molekulatömeg vagy látszólagos molekulatömeg ismert összetételű keverékek/polimerek esetén, vagy a vizsgálat lebonyolítása szempontjából releváns egyéb információ;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— oldhatóság X-VIVO™ 15-ben. Az X-VIVOTM 15-ben oldhatatlan vegyi anyagok esetében: a centrifugálást követően megfigyeltek-e kicsapódást vagy flotációt;

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak.

— nem X-VIVO™ 15 használata esetén az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indokolása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Kontrollok

Pozitív kontroll

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok), SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet és/vagy más azonosítók alapján;

— fizikai megjelenés, vízben való oldhatóság, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben rendelkezésre állnak és szükség szerint;

▼**M8**

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— vizsgálat előtti kezelés, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés);

— vizsgált koncentráció(k);

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— adott esetben hivatkozás a pozitív történeti kontrollok eredményeire, amelyek a vizsgálatmenet elfogadhatósági kritériumainak való megfelelőséget bizonyítják.

Negatív kontroll:

— kémiai azonosítása, például IUPAC- vagy CAS-név (nevek), CAS-szám(ok) és/vagy más azonosítók alapján;

— tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb.;

— fizikai megjelenés, molekulatömeg, valamint további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok, amennyiben a vizsgálati iránymutatásban említett negatív kontrollanyagoktól eltérő negatív kontrollanyagok használatosak, és amennyiben rendelkezésre állnak;

— tárolási feltételek és stabilitás, amennyiben rendelkezésre állnak;

— az oldószer kiválasztásának indoklása minden egyes vizsgálati vegyi anyag esetében.

Vizsgálati körülmények

— a megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe;

— az alkalmazott vizsgálat leírása;

— használt sejtvonal, tárolási feltételei és eredete (például az a létesítmény, ahonnan azt beszerezték);

— a magzati borjú szérum gyártási száma és eredete, a forgalmazó neve, a 96 lyukú, lapos fenekű fekete lemez gyártási száma, valamint a Tripluc reagens gyártási száma;

— a vizsgálathoz használt sejtek passzálásának száma és sűrűsége;

— a vizsgálat előtt a leoltáshoz alkalmazott sejtszámlálási módszer és a homogén sejtszám-eloszlás biztosítása érdekében hozott intézkedések;

— az alkalmazott luminométer (például modell), beleértve a műszer beállításait, a használt luciferáz szubsztrátot, valamint a megfelelő lumineszcencia-mérések szemléltetése a 3.2. függelékben ismertetett kontrollvizsgálat alapján;

— a vizsgálat végrehajtásában való laboratóriumi jártasság bizonyítására alkalmazott eljárás (például jártassági tesztanyagok vizsgálatával) vagy a vizsgálat idővel reprodukálható végrehajtásának bizonyítására alkalmazott eljárás.

A vizsgálat menete

— az alkalmazott replikátumok és vizsgálatmenetek száma;

— a vizsgálati vegyi anyag koncentrációi, alkalmazási eljárása és az expozíciós idő (ha eltér az ajánlottól);

▼**M8**

— az alkalmazott értékelési és döntési kritériumok leírása;

— az alkalmazott vizsgálat-elfogadhatósági kritériumok leírása;

— a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása.

Eredmények

— az IL8LA és a GAPLA mért értékei;

— az nIL8LA, az Ind-IL8LA és az Inh-GAPLA kiszámolt értékei;

— az Ind-IL8LA 95 %-os konfidenciaintervalluma;

— a luciferáz-aktivitás indukciójára és az életképességre vonatkozó dózis-válasz görbéket ábrázoló grafikon;

— adott esetben bármely más releváns észrevétel leírása.

Az eredmények tárgyalása

— az IL-8 Luc vizsgálattal kapott eredmények tárgyalása;

— a vizsgálat eredményeinek integrált vizsgálati és értékelési megközelítés keretében történő tárgyalása, amennyiben rendelkezésre állnak más releváns információk.

Következtetés

SZAKIRODALOM

(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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: 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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: 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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: 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, Párizs, Franciaország.

(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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs. Elérhető a következő címen: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, elérhető a következő címen: 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, Párizs, Franciaország.

(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. Elérhető a következő címen: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

▼M8

3.1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: a vizsgálattal kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálat megfelelőségének mutatója, és relevanciájának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés” szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket (16).

Káros kimeneti út (Adverse Outcome Pathway, AOP): valamely megcélzott vegyi anyag vagy hasonló vegyi anyagok csoportjának kémiai szerkezetéből kiinduló, a molekuláris kiváltó eseményen keresztül az érintett in vivo eredményig végbemenő eseménysorozat (20).

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

CV05: 05-ös életképesség, vagyis az a legalacsonyabb koncentráció, amelynél a vegyi anyag az Inh-GAPLA 0,05 alatti szintjét idézi elő.

FInSLO-LA: az Ind-IL8LA értékre utaló rövidítés, amelyet az IL-8 Luc vizsgálatra vonatkozó validálási jelentésben és korábbi publikációkban használtak. Meghatározását lásd az Ind-IL8LA címszó alatt.

GAPLA: a stabil vörös luciferáz (SLR) luciferáz-aktivitása (λmax = 630 nm), amelyet a GAPDH promóter szabályoz, és amely a sejtéletképességről és az élő sejtek számáról nyújt felvilágosítást.

Veszély: valamely anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy káros hatásokat képes előidézni az élő szervezet, rendszer vagy (al)populáció anyagnak való expozíciójakor.

Integrált vizsgálati és értékelési megközelítés: valamely vegyi anyag vagy vegyianyag-csoport veszélyeinek azonosításához (potenciál), jellemzéséhez (hatáserősség) és/vagy biztonsági értékeléséhez (potenciál, hatáserősség és expozíció) alkalmazott strukturált megközelítés, amely stratégiai szempontból beépít és mérlegel minden olyan releváns adatot, amely hozzájárul a lehetséges veszélyre és/vagy kockázatra és/vagy a további célirányos és ezért minimális vizsgálat szükségességére vonatkozó szabályozói döntéshozatalhoz.

II-SLR-LA: az Inh-GAPLA értékre utaló rövidítés, amelyet az IL-8 Luc vizsgálatra vonatkozó validálási jelentésben és korábbi publikációkban használtak. Meghatározását lásd az Inh-GAPLA címszó alatt.

IL-8 (Interleukin-8): endoteliális sejtekből, fibroblasztokból, keratinsejtekből, makrofágokból és monocitákból származó citokin, amely a neutrofilek és a T-sejt limfociták kemotaxisát idézi elő.

IL8LA: a stabil narancssárga luciferáz (SLO) luciferáz-aktivitása (λmax = 580 nm), amelyet az IL-8 promóter szabályoz.

Ind-IL8LA: az nIL8LA indukciós faktora. Meghatározásához elosztják a vegyi anyaggal kezelt THP-G8 sejtek nIL8LA értékét a nem stimulált THP-G8 sejtek nIL8LA értékével, az Ind-IL8LA a vegyi anyagok által előidézett IL-8 promóter aktivitás mutatója.

Inh-GAPLA: A GAPLA gátlása. Meghatározásához elosztják a vegyi anyaggal kezelt THP-G8 sejtek GAPLA értékét a nem kezelt THP-G8 sejtek GAPLA értékével, az Inh-GAPLA a vegyi anyagok által előidézett citotoxicitás mutatója.

Minimális indukciós küszöbérték (MIT): az a legalacsonyabb koncentráció, amelynél a vegyi anyag eleget tesz a pozitív besorolás kritériumainak.

▼M8

Keverék: két vagy több anyagot tartalmazó elegy vagy oldat.

Egy összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben az egyik fő összetevő legalább 80 tömegszázalékban van jelen.

Több összetevőből álló anyag: olyan, a mennyiségi összetétele alapján meghatározott anyag, amelyben egynél több fő összetevő több mint 10 tömegszázalékban, de 80 tömegszázalékot nem meghaladó koncentrációban van jelen. A több összetevőből álló anyag gyártási folyamat eredménye. A keverék és a több összetevőből álló anyag között az a különbség, hogy a keverék két vagy több anyag összekeverésével, kémiai reakció nélkül jön létre. A több összetevőből álló anyag kémiai reakció eredménye.

nIL8LA: az IL-8 promóter aktivitását tükröző SLO luciferáz-aktivitás (IL8LA) a GAPDH promóter aktivitását tükröző SLR luciferáz-aktivitással (GAPLA) normalizálva. A sejtéletképesség és a sejtszám figyelembevételét követő IL-8 luciferáz-aktivitás mutatója.

nSLO-LA: az nIL8LA értékre utaló rövidítés, amelyet az IL-8 Luc vizsgálatra vonatkozó validálási jelentésben és korábbi publikációkban használtak. Meghatározását lásd az nIL8LA címszó alatt.

Pozitív kontroll: a vizsgálati rendszer valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt replikátum. Annak biztosítása érdekében, hogy a pozitív kontrollban jelentkező hatás időbeli változását fel lehessen mérni, a pozitív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Pre-haptének: abiotikus átalakulás révén szenzibilizálóvá váló vegyi anyagok.

Pro-haptének: olyan vegyi anyagok, amelyek enzimatikus aktivációt igényelnek bőrszenzibilizáló hatásuk kifejtéséhez.

Relevancia: a vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálat pontosságát (az eredmények egyezését) figyelembe kell venni (16).

Megbízhatóság: a vizsgálat laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti időbeli reprodukálhatóságának mértéke ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumon belüli megismételhetőség kiszámításával történik (16).

Vizsgálatmenet: egy vizsgálatmenet során egy vagy több vizsgálati vegyi anyagot vizsgálnak egy párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollal és egy pozitív kontrollal.

Érzékenység: az összes olyan pozitív/aktív vegyi anyag aránya, amelyet a vizsgálat helyesen sorolt be. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (16).

SLO-LA: az IL8LA értékre utaló rövidítés, amelyet az IL-8 Luc vizsgálatra vonatkozó validálási jelentésben és korábbi publikációkban használtak. Meghatározását lásd az IL8LA címszó alatt.

SLR-LA: a GALPA értékre utaló rövidítés, amelyet az IL-8 Luc vizsgálatra vonatkozó validálási jelentésben és korábbi publikációkban használtak. Meghatározását lásd a GAPLA címszó alatt.

▼M8

Oldószeres/vivőanyagos kontroll: valamely vizsgálati rendszernek a vizsgálati vegyi anyagon kívüli összes összetevőjét tartalmazó kezeletlen minta, amely azonban magában foglalja az alkalmazott oldószert/vivőanyagot. Az ugyanabban az oldószerben/vivőanyagban feloldott vagy stabilan diszpergált vizsgálati vegyi anyaggal kezelt minták esetében a kiindulási érték létrehozásához használatos. Párhuzamos tápoldatos kontrollal elvégzett vizsgálata esetén ez a minta azt is bizonyítja, hogy az oldószer/vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati rendszerrel.

Specificitás: a vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (16).

Anyag: természetes állapotban előforduló vagy termelőfolyamatból származó kémiai elemek és azok vegyületei, amelyek a termék stabilitásának megőrzéséhez szükséges adalékanyagokat és az alkalmazott folyamatból származó szennyeződéseket is tartalmazhatnak, de nem tartalmaznak olyan oldószereket, amelyek az anyag stabilitásának befolyásolása vagy összetételének megváltozása nélkül elkülöníthetők.

Felületaktív anyag: olyan anyag (például mosószer), amely csökkentheti a folyadékok felületi feszültségét, és így lehetővé teszi, hogy habozzanak vagy áthatoljanak szilárd anyagokon; nedvesítőszerként is ismert. (TG437)

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

THP-G8: az IL-8 Luc vizsgálatban használt IL-8 riporter sejtvonal. A humán makrofágszerű THP-1 sejtvonalat transzfektálták az IL-8 promóterrel szabályozott stabil narancssárga luciferáz (SLO) luciferáz génnel és a GAPDH promóterrel szabályozott stabil vörös luciferáz (SLR) luciferáz génnel.

A vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének az Egyesült Nemzetek Szervezete által globálisan harmonizált rendszere (ENSZ-GHS): a vegyi anyagoknak (anyagoknak és keverékeknek) a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkáltatók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse a vegyi anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (21).

UVCB: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

Érvényes vizsgálati módszer: olyan vizsgálat, amely kellően relevánsnak és megbízhatónak minősül egy adott célra, és amely tudományosan megalapozott elveken alapul. Egy-egy vizsgálat abszolút értelemben soha nem érvényes, kizárólag meghatározott céllal összefüggésben.

▼**M8**

3.2. függelék

A LUCIFERÁZ-AKTIVITÁS MÉRÉSÉNEK ÉS AZ SLO/SLR MÉRÉSÉHEZ HASZNÁLT OPTIKAI SZŰRŐ TRANSZMISSZIÓS KOEFFICIENSE MEGHATÁROZÁSÁNAK ELVE

Több riportert alkalmazó vizsgálati rendszer – Tripluc – használható, több színt detektálására képes rendszerrel működő mikrolemez típusú luminométerrel, amely felszerelhető optikai szűrővel (pl. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). A mérések során használt optikai szűrő 600–620 nm-es long vagy short pass szűrő, illetve 600–700 nm-es sávszűrő.

Két különböző színű luciferáz mérése egy optikai szűrővel

Az alábbi példában Phelios AB-2350 (ATTO) típusú szűrőt használtak. Ez a luminométer az SLO (λmax = 580 nm) és az SLR (λmax = 630 nm) lumineszcens jeleinek megkülönböztetésére egy 600 nm-es long pass szűrőt alkalmaz (R60 HOYA Co., 600 nm-es LP, 1. szűrő).

A 600 nm-es LP-szűrő transzmissziós koefficiensének meghatározásához tisztított SLO és SLR luciferáz enzim használatával megmérik i. az SLO és az SLR biolumineszcenciájának intenzitását szűrő nélkül (F0), ii. az SLO és az SLR biolumineszcenciájának intenzitását 600 nm-es LP-szűrőn (1. szűrőn) keresztül, valamint iii. kiszámolják a 600 nm-es LP-szűrő alábbi transzmissziós koefficienseit az SLO és az SLR méréséhez.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	$=\kappa O_{R60}$	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Ha a vizsgálati minta SLO intenzitását O-val, SLR intenzitását R-rel jelöljük, akkor i) a fény (optikai) szűrő nélküli intenzitása (F0) és ii) a 600 nm-es LP-szűrőn (1. szűrőn) keresztül haladó fény intenzitása (F1) az alábbiak szerint határozható meg.

$F0=O+R$

$F1=\kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Ezeket a képleteket az alábbi módon is fel lehet állítani:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Ezt követően a kiszámított transzmissziós tényezők (κO_{R60} és κR_{R60}), valamint a mért F0 és F1 alapján kiszámolható az O és az R értéke:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

▼M8

A transzmissziós tényező meghatározásához használat eszközök és módszerek

1. *Reagensek*

Az egyes tisztított luciferáz enzimek:

Liofilizált tisztított SLO enzim

Liofilizált tisztított SLR enzim

(amelyeket a validálási tevékenységek céljára a GPC Lab. Co. Ltd. vállalattól (Tottori, Japán) szereztek be, a THP-G8 sejtvonallal együtt)

Vizsgálati reagens:

Tripluc® luciferáz vizsgálati reagens (beszerezhető például: TOYOBO, kat.száma: MRA-301)

Tápoldat: a luciferáz vizsgálathoz (30 ml, 2–8 °C-on tárolva)

Reagens	Konc.	Végső konc. tápoldatban	Szükséges mennyiség
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

2. *Az enzimoldat elkészítése*

Csőbe helyezett liofilizált tisztított luciferáz enzimet oldjunk fel 10 tömegszázalékos glicerinnel kiegészített, 200 µl mennyiségű 10 ~ 100 mM Tris/HCl-dal vagy Hepes/HCl-dal (pH-értéke: 7,5 ~ 8,0), majd az enzimoldatot 10 µl mennyiségben adagoljuk ki 1,5 ml-es eldobható csövekbe, és tároljuk fagyasztóban, –80 °C-on. A fagyasztott enzimoldat akár 6 hónapig is felhasználható. Felhasználásukkor az enzimoldatot tartalmazó csövekhez adjunk hozzá 1 ml-t a luciferáz vizsgálat tápoldatából (10 % FBS-sel kiegészített RPMI-1640), így egy hígított enzimoldatot kapunk, amelyet az enzim deaktivációjának megelőzése érdekében jégen kell tartani.

3. *A biolumineszcencia mérése*

Olvasszuk fel a Tripluc® luciferáz vizsgálati reagenst (Tripluc), és tartsuk szobahőmérsékletű vízfürdőben vagy szobahőmérsékletű levegőn. A fotomultiplikátor stabilizálódása érdekében a mérés előtt 30 perccel kapcsoljuk be a luminométert. Helyezzünk át 100 µl feloldott enzimoldatot egy fekete 96 lyukú (lapos fenekű) lemezre (az SLO referenciamintáját a B1, B2 és B3 lyukakba, az SLR referenciamintáját pedig a D1, D2 és D3 lyukakba). Ezt követően pipettával adagoljunk 100 µl felmelegített Tripluc reagenst a lemez feloldott enzimoldatot tartalmazó valamennyi lyukába. Lemezrázón rázassuk a lemezt szobahőmérsékleten (kb. 25 °C-on) 10 percig. Ha a lyukakban lévő oldatokban buborékok keletkeznének, távolítsuk el azokat. Helyezzük a lemezt a luciferáz-aktivitás méréséhez a luminométerbe. A biolumineszcenciát 3 másodpercig mérik optikai szűrő nélkül (F0) és optikai szűrővel (F1).

Az optikai szűrő transzmissziós koefficiensét az alábbi módon határozhatjuk meg:

Transzmissziós koefficiens (SLO (κO_{R60})) = (B1-nél mért F1+ B2-nél mért F1+ B3-nál mért F1) / (B1-nél mért F0 + B2-nél mért F0 + B3-nál mért F0)

▼**M8**

Transzmissziós koefficiens (SLR (κO_{R60})) = (D1-nél mért F1+ D2-nél mért F1+ D3-nál mért F1) / (D1-nél mért F0 + D2-nél mért F0 + D3-nál mért F0)

Az ily módon meghatározott transzmissziós tényezők az adott luminométerrel végzett valamennyi méréshez felhasználhatók.

A berendezések minőség-ellenőrzése

Az IL-8 Luc vizsgálati protokollban leírt eljárásokat kell használni (18).

▼M8

3.3. függelék

JÁRTASSÁGI TESZTANYAGOK

A B.71. vizsgálati módszer e függelékben ismertetett vizsgálatának rutinszerű alkalmazása előtt a laboratóriumoknak igazolniuk kell szakmai jártasságukat oly módon, hogy az 1. táblázatban javasolt 9 anyagra vonatkozóan az IL-8 Luc vizsgálattal várható előrejelzést kapják meg, továbbá a 9 jártassági tesztanyag közül legalább 8 esetében referenciatartományba eső értékeket kapnak (e jártassági tesztanyagokat úgy választották ki, hogy a bőrszenzibilizáció veszélye esetén bekövetkező válaszreakciók teljes tartományát képviseljék). A kiválasztás többi kritériuma az volt, hogy a vegyi anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, azokra vonatkozóan kiváló minőségű in vivo referenciaadatok álljanak rendelkezésre, és az IL-8 Luc vizsgálat alapján kiváló minőségű in vitro adatok álljanak rendelkezésre. Az IL-8 Luc vizsgálathoz rendelkezésre állnak publikált referenciaadatok is (6) (1).

1. táblázat

Az IL-8 Luc vizsgálatban való szakmai jártasság bizonyításához ajánlott anyagok

Jártassági tesztanyagok	CAS-szám	Oldhatósági állapot 20 mg/ml X-VIVO15-ben	In vivo előrejelzés [1]	IL-8 Luc előrejelzés [2]	Referenciatartomány µg/ml) [3]	
					CV_{05} [4]	IL-8 Luc MIT [5]
2,4-Dinitro-klór-benzol	97-00-7	Szilárd	Oldhatatlan	Szenzibilizáló (szélsőségesen)	Pozitív	2,3–3,9	0,5–2,3
Formaldehid	50-00-0	Folyadék	Oldható	Szenzibilizáló (erősen)	Pozitív	9–30	4–9
2-Merkaptobenzotiazol	149-30-4	Szilárd	Oldhatatlan	Szenzibilizáló (mérsékelten)	Pozitív	250–290	60–250
Etilén-diamin	107-15-3	Folyadék	Oldható	Szenzibilizáló (mérsékelten)	Pozitív	500–700	0,1–0,4
Etilén-glikol-dimetakrilát	97-90-5	Folyadék	Oldhatatlan	Szenzibilizáló (enyhén)	Pozitív	> 2000	0,04–0,1
4-Allil-anisol (esztragol)	140-67-0	Folyadék	Oldhatatlan	Szenzibilizáló (enyhén)	Pozitív	> 2000	0,01–0,07
Sztreptomicin-szulfát	3810-74-0	Szilárd	Oldható	Nem szenzibilizáló	Negatív	> 2000	> 2000
Glicerin	56-81-5	Folyadék	Oldható	Nem szenzibilizáló	Negatív	> 2000	> 2000
Izopropanol	67-63-0	Folyadék	Oldható	Nem szenzibilizáló	Negatív	> 2000	> 2000

Rövidítések: CAS-szám = Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat (CAS) nyilvántartási szám.
[1] Az in vivo hatáserősség levezetése az ECETOC által javasolt kritériumok segítségével történik (19).
[2] A megfigyelt dokumentált értékek alapján (1) (6).
[3] A CV_{05} és az IL-8 Luc MIT értékét az EPI Suite™ által megadott vízoldékonyság alapján számították ki.
[4] CV_{05}: az a legalacsonyabb koncentráció, amelynél a vegyi anyag az Inh-GAPLA 0,05 alatti szintjét idézi elő.
[5] MIT: az a legalacsonyabb koncentráció, amelynél a vegyi anyag eleget tesz a pozitív besorolás kritériumainak.

▼M8

3.4. függelék

INDEXEK ÉS DÖNTÉSI KRITÉRIUMOK

nIL8LA (nSLO-LA)

Az IL8LA (SLO-LA) és a GAPLA (SLR-LA) tekintetében megmérik az i. koncentráció (i = 0–11) j. ismétlését (j = 1–4). A normalizált IL8LA, vagyis az nIL8LA (nSLO-LA), az alábbiak szerint határozható meg:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Ez a vizsgálat alapvető mutatója.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Az ismétlés átlagos nIL8LA (nSLO-LA) értékének az i. koncentrációban tapasztalt növekedési faktora összevetve a 0. koncentráció növekedési faktorával, ez a vizsgálat elsődleges mutatója. A két növekedési faktor aránya az alábbi egyenlettel írható le:

$$\mathrm{Ind-IL8LA_i} = \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{ij}}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{0j}}\right\}$$

A vezető laboratórium javaslata szerint az 1,4-es érték a vizsgálati vegyi anyag pozitív besorolását eredményezi. Ez az érték a vezető laboratórium dokumentált adatainak vizsgálatán alapul. Az adatkezelő csoport ezt az értéket használta a validálási tanulmány valamennyi szakaszában. Az elsődleges eredmény, az Ind-IL8LA a két számtani átlag aránya, ahogyan az az egyenletből is látszik.

95 %-os konfidenciaintervallum (95 % CI)

Az Ind-IL8LA arányon alapuló 95 %-os konfidenciaintervallum (95 % CI) megbecsülésével kimutatható az elsődleges eredmény mérésének pontossága. Amennyiben a 95 %-os konfidenciaintervallum alsó határértéke legalább 1, az arra utal, hogy az i. koncentrációnál elért nIL8LA érték jelentősen nagyobb az oldószeres kontroll nIL8LA értékénél. A 95 %-os konfidenciaintervallum meghatározásának több módja is létezik. Ebben a vizsgálatban az úgynevezett Fieller-tételt alkalmaztuk. E tétel alapján a 95 %-os konfidenciaintervallumot az alábbi egyenlet segítségével határozhatjuk meg:

$$\left[\frac{-\mathrm{B} - \sqrt{\mathrm{B}^2 - 4\mathrm{AC}}}{2\mathrm{A}}, \frac{-\mathrm{B} + \sqrt{\mathrm{B}^2 - 4\mathrm{AC}}}{2\mathrm{A}}\right],$$

ahol: . a

$$\mathrm{A} = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$\mathrm{B} = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$\mathrm{C} = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \textstyle\sum_j \mathrm{nIL8LA_{0j}}$$

▼**M8**

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

a centrális t eloszlás 97,5. percentilise ν szabadságfokkal, ahol

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Az Inh-GAPLA az ismétlés i. koncentrációjában mért átlagos GAPLA (SLR-LA) érték és az oldószeres kontroll átlagos GAPLA (SLR-LA) értékének aránya, amely az alábbi egyenlettel írható le:

$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

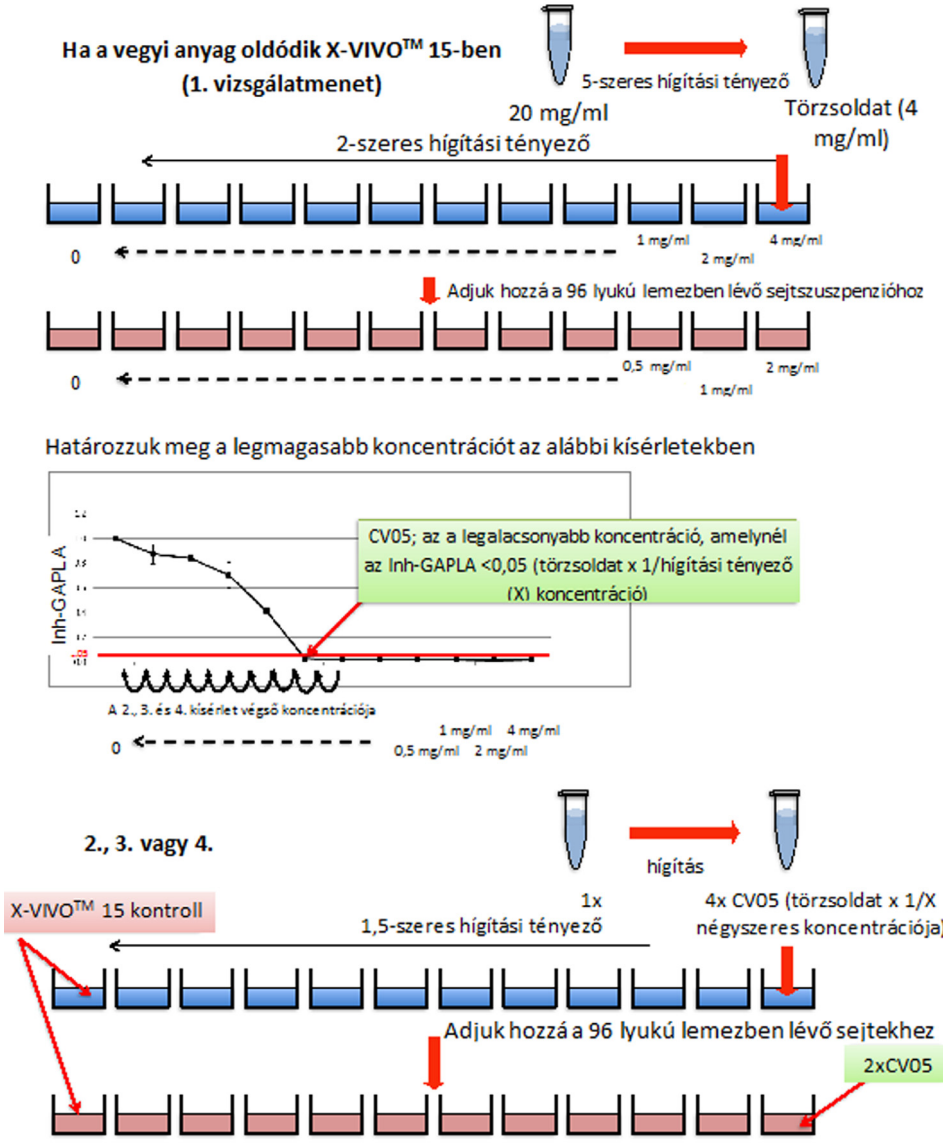
Mivel a GAPLA az nIL8LA nevezője, a szélsőségesen alacsony értékek az nIL8LA nagy variabilitását jelzik. Ezért előfordulhat, hogy a szélsőségesen alacsony (0,05-nál kisebb) Inh-GAPLA értékkel rendelkező Ind-IL8LA értékek csekély pontosságúak.

▼**M8**

3.5. függelék

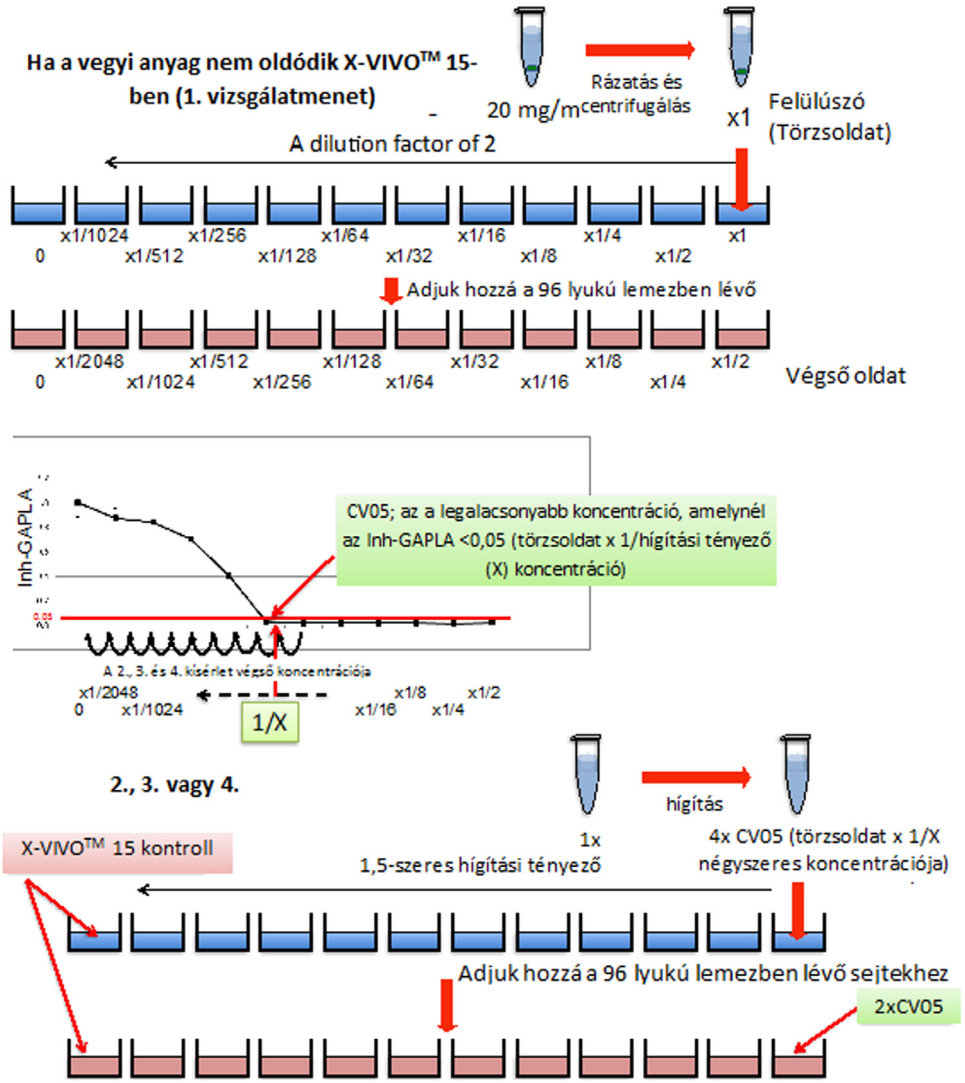
AZ IL-8 LUC VIZSGÁLATBAN A VEGYI ANYAGOK FELOLDÁSÁRA ALKALMAZOTT MÓDSZEREK SEMATIKUS ÁBRÁJA

a) A 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO™ 15-ben oldódó vegyi anyagok esetében



▼**M8**

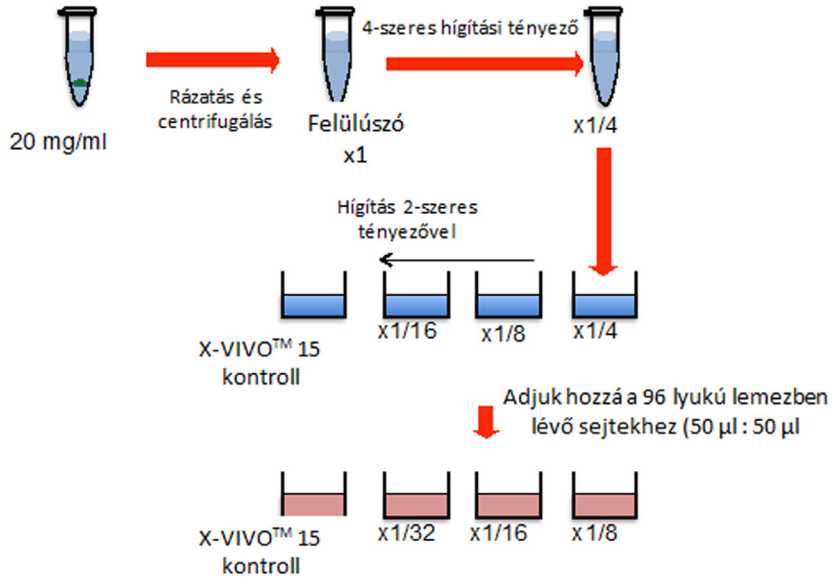
b) A 20 mg/ml koncentrációjú X-VIVO™ 15-ben nem oldódó vegyi anyagok esetében



▼**M8**

3.6. függelék

AZ IL-8 LUC VIZSGÁLATBAN A POZITÍV KONTROLLANYAGKÉNT SZOLGÁLÓ 4-NBB FELOLDÁSÁRA ALKALMAZOTT MÓDSZER SEMATIKUS ÁBRÁJA



▼B

C. RÉSZ: AZ ÖKOTOXICITÁS MEGHATÁROZÁSÁNAK MÓDSZEREI

TARTALOMJEGYZÉK

C.1.	AKUT TOXICITÁS HAL ESETÉBEN
C.2.	DAPHNIA-FAJOK AKUT IMMOBILIZÁCIÓS VIZSGÁLATA
C.3.	SZAPORODÁSGÁTLÁSI VIZSGÁLAT, ÉDESVÍZI ALGÁK ÉS CIANOBAKTÉRIUMOK
C.4.	A „GYORS” BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG MEGHATÁROZÁSA
I. RÉSZ	ÁLTALÁNOS
II. RÉSZ	DOC (OLDOTT SZERVES SZÉN) CSÖKKENÉSÉNEK VIZSGÁLATA (C.4-A. módszer)
III. RÉSZ.	MÓDOSÍTOTT OECD-VIZSGÁLAT (DOC-CSÖKKENÉS) (C.4-B. módszer).
IV. RÉSZ	CO_2-FEJLŐDÉS-VIZSGÁLAT (C.4-C. módszer)
V. RÉSZ	MANOMETRIKUS RESPIROMETRIÁS MÉRÉS (C.4-D. módszer)
VI. RÉSZ.	ZÁRTPALACK-MÓDSZER (C.4-E. módszer)
VII. RÉSZ	MITI-VIZSGÁLAT (C.4-F. módszer)
C.5.	LEBOMLÁS – BIOKÉMIAI OXIGÉNIGÉNY
C.6.	LEBOMLÁS – KÉMIAI OXIGÉNIGÉNY
C.7.	LEBOMLÁS – ABIOTIKUS LEBOMLÁS: HIDROLÍZIS A PH FÜGGVÉNYÉBEN.
C.8.	TOXICITÁS FÖLDIGILISZTÁKRA
C.9.	BIOLÓGIAI LEBOMLÁS – ZAHN–WELLENS VIZSGÁLAT
C.10.	AEROB SZENNYVÍZTISZTÍTÁS-SZIMULÁCIÓS VIZSGÁLAT: C.10-A: ELEVENISZAPOS BERENDEZÉSEK – C.10-B: BIOFILMEK
C.11.	ELEVENISZAP LÉGZÉSGÁTLÓ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA (SZÉN ÉS AMMÓNIUM OXIDÁCIÓJA)
C.12.	BIOLÓGIAI LEBOMLÁS – MÓDOSÍTOTT SCAS-VIZSGÁLAT
C.13.	BIOAKKUMULÁCIÓ HALAKBAN: VÍZI VAGY ÉTRENDI EXPOZÍCIÓ
C.14.	HALIVADÉKOK NÖVEKEDÉSI VIZSGÁLATA
C.15.	RÖVID TÁVÚ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT HALEMBRIÓKKAL ÉS HALLÁRVÁKKAL
C.16.	HÁZIMÉH – AKUTORÁLISTOXICITÁS-VIZSGÁLAT
C.17.	HÁZIMÉH – AKUTKONTAKTTOXICITÁS-VIZSGÁLAT
C.18.	KÉMIAI ANYAGOK TALAJON TÖRTÉNŐ ADSZORPCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA EGYENSÚLYI RENDSZERBEN

▼B

C.19.	ADSZORPCIÓS EGYÜTTHATÓ BECSLÉSE TALAJON ÉS SZENNYVÍZISZAPON NAGYHATÉKONYSÁGÚ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁVAL (HPLC)
C.20.	*DAPHNIA MAGNÁN* VÉGZETT REPRODUKCIÓS VIZSGÁLAT
C.21.	TALAJLAKÓ MIKROORGANIZMUSOK: NITROGÉN-ÁTALAKÍTÁSI VIZSGÁLAT
C.22.	TALAJLAKÓ MIKROORGANIZMUSOK: SZÉNÁTALAKÍTÁSI VIZSGÁLAT
C.23.	AEROB ÉS ANAEROB ÁTALAKÍTÁS A TALAJBAN
C.24.	AEROB ÉS ANAEROB ÁTALAKÍTÁS VÍZI ÜLEDÉKRENDSZEREKBEN
C.25.	AEROB MINERALIZÁCIÓ FELSZÍNI VIZEKBEN – VIZSGÁLAT A BIOLÓGIAI LEBONTÁS SZIMULÁLÁSÁRA
C.26.	A *LEMNA*-FAJOK NÖVEKEDÉSGÁTLÁSI VIZSGÁLATA
C.27.	SZENNYEZETT ÜLEDÉKKEL VÉGZETT ÜLEDÉK-VÍZ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT ÁRVASZÚNYOGLÁRVÁKKAL
C.28.	SZENNYEZETT VÍZZEL VÉGZETT ÜLEDÉK-VÍZ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT ÁRVASZÚNYOGLÁRVÁKKAL
C.29.	GYORS BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG: SZÉN-DIOXID-VIZSGÁLAT LÉGMENTESEN ZÁRT EDÉNYEKBEN (A GŐZTÉR CO_2-TARTALMÁNAK VIZSGÁLATA)
C.30.	BIOLÓGIAI FELHALMOZÓDÁS SZÁRAZFÖLDI KEVÉSSERTÉJŰEKBEN
C.31.	SZÁRAZFÖLDI NÖVÉNYEK VIZSGÁLATA: CSÍRÁZÁS ÉS CSÍRANÖVEKEDÉS
C.32.	TELEVÉNYFÉRGEK SZAPORODÁSÁNAK VIZSGÁLATA
C.33.	FÖLDIGILISZTÁK SZAPORODÁSÁNAK VIZSGÁLATA (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI*)
C.34.	AZ ANAEROB BAKTÉRIUMAKTIVITÁS GÁTLÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSA – AZ ANAEROB EMÉSZTÉSŰ (SZENNYVÍZ) ISZAP GÁZTERMELÉSÉNEK CSÖKKENTÉSE
C.35.	ÜLEDÉKBEN ÉS VÍZBEN ÉLŐ *LUMBRICULUS* TOXICITÁSI VIZSGÁLATA SZENNYEZETT ÜLEDÉKBEN
C.36.	RAGADOZÓ ATKA (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*) SZAPORODÁSÁNAK VIZSGÁLATA TALAJBAN
C.37.	21 NAPOS HALVIZSGÁLAT: AZ ÖSZTROGÉN- ÉS ANDROGÉNHATÁS, VALAMINT AZ AROMATÁZGÁTLÁS RÖVID TÁVÚ SZŰRŐVIZSGÁLATA
C.38.	KÉTÉLTŰ-ÁTALAKULÁSI VIZSGÁLAT
C.39.	UGRÓVILLÁSOK SZAPORODÁSÁNAK TALAJBAN VÉGZETT VIZSGÁLATA

▼B

C.40.	ÁRVASZÚNYOGOK ÉLETCIKLUSÁRA HATÓ TOXICITÁS VIZSGÁLATA ÜLEDÉK-VÍZ RENDSZERBEN, SZENNYEZETT VÍZ VAGY SZENNYEZETT ÜLEDÉK HASZNÁLATÁVAL
C.41.	HALAK IVARI FEJLŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA
C.42.	BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG TENGERVÍZBEN
C.43.	SZERVES ANYAGOK ANAEROB BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁGA ROTHASZTOTT ISZAPBAN: A GÁZTERMELÉS MÉRÉSÉN ALAPULÓ MÓDSZER
C.44.	KIMOSÓDÁS TALAJOSZLOPOKBAN
C.45.	A KONZERVÁLÓSZERREL KEZELT FAANYAGOKBÓL A KÖRNYEZETBE TÖRTÉNŐ KIBOCSÁTÁSOK BECSLÉSE: LABORATÓRIUMI MÓDSZEREK FÁBÓL KÉSZÜLT, NEM FEDETT, ÉDES- VAGY TENGERVÍZZEL ÉRINTKEZÉSBEN LÉVŐ ÁRUCIKKEK VIZSGÁLATÁRA
C.46.	BIOLÓGIAI FELHALMOZÓDÁS ÜLEDÉKLAKÓ BENTIKUS KEVÉSSERTÉJŰEKBEN
C.47.	A HALAK KORAI ÉLETSZAKASZÁRA VONATKOZÓ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT
C.48.	A HALAKON VÉGZETT RÖVID TÁVÚ REPRODUKCIÓS VIZSGÁLAT
C.49.	A HALEMBRIÓK AKUT TOXICITÁSI VIZSGÁLATA
C.50.	*MYRIOPHYLLUM SPICATUM*MAL VÉGZETT ÜLEDÉKMENTES TOXICITÁSI VIZSGÁLAT
C.51.	*MYRIOPHYLLUM SPICATUMMAL* VÉGZETT VÍZ–ÜLEDÉK RENDSZERŰ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT
C.52.	FOGASPONTYON VÉGZETT KIBŐVÍTETT EGYGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS VIZSGÁLAT (MEOGRT)
C.53.	KÉTÉLTŰ LÁRVÁK NÖVEKEDÉSI ÉS FEJLŐDÉSI VIZSGÁLATA (LAGDA)

▼B

C.1. **AKUT TOXICITÁS HAL ESETÉBEN**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat célja valamely anyag akut letális toxicitásának meghatározása édesvízi halak esetében. Hasznosnak bizonyul, ha rendelkezésre állnak információk az anyag vízoldékonyságáról, gőznyomásáról, kémiai stabilitásáról, disszociációs állandóiról és biológiai lebonthatóságáról annak érdekében, hogy a legmegfelelőbb vizsgálati módszert lehessen kiválasztani (statikus, félstatikus vagy átfolyásos) a vizsgálat időtartama alatt a vizsgált anyag kielégítően állandó koncentrációinak biztosításához.

Mind a vizsgálat tervezéséhez, mind az eredmények értelmezéséhez figyelembe kell venni további információkat is (ilyenek például a szerkezeti képlet, a tisztasági fok, szennyeződések jellege és százalékos aránya, adalékanyagok jelenléte és mennyisége, az n-oktanol/víz megoszlási koefficiens).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Az akut toxicitás valamely anyag hatásának való kitételkor (expozíció) rövid időn (napokon) belül, valamely szervezetben előidézett, észlelhető káros hatás. E vizsgálatban az akut toxicitást a közepes letális koncentrációval (LC_{50}) kell kifejezni, vagyis azzal a vízben mért koncentrációval, amely a kísérleti halak csoportjának 50 %-ánál halált okoz valamilyen folyamatos expozíciós időtartamon belül, amelyet meg kell adni.

A vizsgált anyag minden koncentrációját tömeg/térfogat (milligramm/liter) mértékegységben kell megadni. E koncentrációk tömeg/tömeg mértékegységben ($mg \cdot kg^{-1}$) is megadhatók.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Vizsgálható referenciaanyag annak bemutatására, hogy a laboratóriumi vizsgálati körülmények között nem változott-e meg jelentős mértékben a vizsgált fajok reakciója.

E vizsgálathoz nincs előírva referenciaanyag.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Végrehajtható határérték-vizsgálat 100 mg/liter koncentrációban annak bemutatására, hogy az LC_{50} nagyobb, mint e koncentráció.

A halakat a vízhez adott vizsgált anyag hatásának kell kitenni, koncentrációk egész tartományában, 96 órás időtartamon át. A pusztulást legalább 24 órás időközönként fel kell jegyezni, és ahol lehetséges, ki kell számítani az egyes megfigyelési időpontokban a halak 50 %-át elpusztító koncentrációkat (LC_{50}).

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A minőségi követelmények mind a határérték-vizsgálati, mind a teljes vizsgálati módszerre érvényesek.

A kontrollcsoportban a kísérlet végéig a halpusztulásnak nem szabad 10 %-nál nagyobbnak lennie (vagy maximum egy hal pusztulhat el, ha tíznél kevesebb halat használnak).

Az oldott oxigén koncentrációjának mindvégig nagyobbnak kell lennie, mint a levegőtelítettségi érték 60 %-a.

▼B

A vizsgált anyag koncentrációit a kísérlet során mindvégig a kezdeti koncentráció 80 %-án belüli értéken kell tartani.

Az olyan anyagok esetében, amelyek stabil oldatokat képezve könnyen oldódnak a vizsgált közegben, tehát azok, amelyek jelentős mértékben nem fognak párologni, lebomlani, hidrolizálni vagy abszorbeálódni, a kezdeti koncentráció a névleges koncentrációval egyenlőnek tekinthető. Bizonyítani kell, hogy a koncentrációk a vizsgálat során mindvégig megmaradnak, és a minőségi követelmények teljesülnek.

Azon anyagok esetében, amelyek:

i. a vizsgált közegben kevéssé oldhatók; vagy

ii. stabil emulziók vagy diszperziók létrehozására képesek; vagy

iii. vizes oldatokban nem stabilak,

abból kell kiindulni, hogy a kezdeti koncentráció a vizsgálat kezdetén az oldatban mért (vagy ha ez technikailag nem lehetséges, a vízoszlopban mért) koncentráció. A koncentrációt az egyensúlyba hozatal után, de a kísérleti halak behelyezése előtt kell meghatározni.

Ezen esetek közül mindegyikben további méréseket kell végrehajtani a vizsgálat során a tényleges expozíciós koncentrációk megerősítésére, vagy annak megerősítésére, hogy teljesülnek-e a minőségi követelmények.

A pH-nak nem szabad 1 egységnél nagyobb mértékben változnia.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Típusát tekintve háromféle eljárás használható:

Statikus vizsgálat:

Ez olyan toxicitásvizsgálat, amelyben a vizsgált oldat nem áramlik. (Az oldatok mindvégig változatlanok maradnak a vizsgálat végrehajtása során.)

Félstatikus vizsgálat:

Olyan, a vizsgált oldat áramlása nélküli vizsgálat, amelynél rendszeresen, adagonként ki kell cserélni a vizsgált oldatokat hosszabb időtartamok (például 24 óra) eltelte után.

Átfolyásos vizsgálat:

Olyan toxicitásvizsgálat, amelyben a vizet állandóan cserélik a vizsgálati kamrákban, a már használt vízzel együtt elszállítva a vizsgált kémiai anyagot a vizsgált közeg kicserélése érdekében.

1.6.1. **Reagensek**

1.6.1.1. *A vizsgált anyagok oldatai*

El kell készíteni a szükséges erősségű törzsoldatokat az anyagnak ionmentesített vízben vagy az 1.6.1.2. pontnak megfelelő vízben történő feloldásával.

A kiválasztott vizsgált koncentrációkat a törzsoldat hígításával kell elkészíteni. Ha nagy koncentrációkat vizsgálnak, az anyag közvetlenül a hígítóvízben feloldható.

▼B

Az anyagokat általában csak az oldhatóság határáig kell vizsgálni. Néhány anyagnál (például olyan anyagok esetében, amelyeknek kicsi a vízoldékonysága, nagy a P_{ow} értéke, vagy azok esetében, amelyek stabil diszperziót alkotnak, nem pedig valódi oldatot hoznak létre vízben) elfogadható az anyag oldhatósági határa fölötti vizsgált koncentráció használata a maximális oldható/stabil koncentráció elérésének biztosítására. Fontos azonban, hogy e koncentráció ne zavarja meg a vizsgált rendszert valamilyen más módon (például az anyagból a víz felszínén képződött, és a víz oxigénellátását akadályozó film révén).

Ultrahangos diszpergálás, szerves oldószerek, emulgeáló- vagy diszpergálószerek használhatók alacsony vízoldékonyságú anyagok törzsoldatai elkészítésének elősegítésére, vagy a vizsgált közegben az ilyen anyagok diszpergálódásának segítésére. Amikor ilyen segédanyagokat használnak, minden vizsgált koncentrációnak ugyanolyan mennyiségű segédanyagot kell tartalmaznia, és további kontrollhalakat kell kitenni a segédanyag ugyanolyan koncentrációja hatásának, mint amelyet a vizsgálati sorozatokban alkalmaznak. Minden ilyen segédanyag koncentrációját minimális értéken kell tartani, de semmi esetre sem szabad meghaladnia a 100 mg/liter értéket a vizsgált közegben.

A vizsgálatot a pH-érték beállítása nélkül kell végrehajtani. Ha létezik bizonyíték a pH-érték jelentős változására, ajánlatos a vizsgálat megismétlése a pH-érték beállításával, meg kell adni az így kapott eredményeket. Ezen esetben be kell állítani a törzsoldat pH-értékét a hígítóvíz pH-értékére, kivéve ha különleges okok szólnak ellene. E célra a legkedvezőbb a HCl és az NaOH használata. Ezt a pH-korrekciót úgy kell végrehajtani, hogy ne változzon meg jelentős mértékben a vizsgált anyag koncentrációja a törzsoldatban. Ha a beállítás a vizsgált vegyület valamilyen kémiai reakcióját vagy fizikai kicsapódását okozza, ezt közölni kell a jelentésben.

1.6.1.2. *Tároló- és hígítóvíz*

Ivóvízellátó rendszerből vett (klór, nehézfémek vagy más anyagok potenciálisan káros koncentrációival nem szennyezett), jó minőségű természetes víz vagy művíz (lásd az 1. függeléket) használható. A 10 és 250 mg/l közötti keménységű ($CaCO_3$-ként meghatározva), 6,0 és 8,5 közötti pH-jú vizeket kell előnyben részesíteni.

1.6.2. **Készülék**

Minden készüléket kémiailag inert anyagból kell készíteni:

— automatikus hígító rendszer (átfolyásos vizsgálathoz),

— oxigénmérő,

— vízkeménység meghatározására szolgáló berendezés,

— megfelelő készülék a hőmérséklet szabályozásához,

— pH-mérő.

1.6.3. **Kísérleti hal**

A halaknak jó egészségi állapotban kell lenniük, és mindenfajta látható testi hibától mentesnek kell lenniük.

▼B

A kísérlethez használt fajtákat olyan gyakorlati kritériumok alapján kell kiválasztani, mint például egész évbeni könnyű beszerezhetőségük, a problémamentes tartás, a vizsgálati célokra való megfelelőség, relatív érzékenység a kémiai anyagokra és minden olyan gazdasági, biológiai vagy ökológiai tényező, amelynek bármilyen hatása lehet. A halfajták kiválasztásakor a kapott adatok összehasonlíthatóságát és a nemzetközi harmonizáció szükségességét (lásd az 1. pontban hivatkozott szakirodalmat) is szem előtt kell tartani.

A 2. függelék ismerteti az e vizsgálat végrehajtásához javasolt halfajták jegyzékét; az előnyben részesített fajták a zebradánió és a szivárványos pisztráng.

1.6.3.1. *Tartás*

A kísérleti halaknak lehetőleg egyetlen állományból kell származniuk, hasonló méretűeknek és korúaknak kell lenniük. A halakat legalább 12 napig a következő körülmények között kell tartani:

betöltés:

a rendszernek (visszaforgatás vagy átáramoltatás) és a halfajtáknak megfelelően,

víz:

lásd az 1.6.1.2. pontot,

világítás:

napi 12–16 órás megvilágítás,

oldott oxigén koncentrációja:

a levegőtelítettségi érték legalább 80 %-a,

etetés:

hetente vagy naponta háromszor, amelyet a vizsgálat kezdete előtt 24 órával befejeznek.

1.6.3.2. *Mortalitás*

A 48 órás szoktatási időtartamot követően fel kell jegyezni az elpusztult állatok számát a következő kritériumok alkalmazásával:

— ha a populáció 10 %-ánál több hal elpusztul 7 napon belül:

akkor a teljes állományt le kell selejtezni,

— ha a populáció 5 és 10 %-a pusztul el:

akkor a tartási idő 7 további nappal meghosszabbodik.

Ha további pusztulás nem történik, az állomány elfogadható, egyébként nem,

— ha a populáció kevesebb, mint 5 %-a pusztul el:

akkor az állomány alkalmazható a vizsgálathoz.

1.6.4. **Szoktatási időtartam**

Az alkalmazás előtt minden halat legalább 7 napig kell tartani olyan minőségű és hőmérsékletű vízben, mint amit a vizsgálat során fognak alkalmazni.

▼B

1.6.5. **A kísérlet végrehajtása**

A vizsgálatot megelőzheti egy előzetes vizsgálat, amely információkkal szolgál arról a koncentrációtartományról, amelyet a fő vizsgálatban kell használni.

A vizsgált sorozaton kívül vizsgált anyag nélküli kontrollvizsgálatot, és a segédanyagot tartalmazó kontrollanyag-vizsgálatot is végre kell hajtani.

A vizsgált vegyület fizikai és kémiai tulajdonságaitól függően statikus, félstatikus vagy átfolyásos vizsgálatot lehet választani, a minőségi követelmények teljesítése érdekében.

A halakat a következő módon kell kitenni az anyag hatásának:

— időtartam: 96 óra,

— állatok száma: koncentrációnként legalább 7,

— tartályok: alkalmas űrtartalmúak, a javasolt egyedsűrűség figyelembevételével,

— egyedsűrűség: 1 g hal/liter ajánlott a statikus és a félstatikus vizsgálatokhoz; az átfolyásos rendszerekhez elfogadható ennél nagyobb egyedsűrűség is,

— vizsgált koncentráció: legalább 5, egymástól 2,2-et nem meghaladó konstans tényezővel eltérő és, amennyire lehetséges, a 0–100 %-os mortalitási tartományt átfedő koncentráció,

— víz: lásd az 1.6.1.2. pontot,

— világítás: 12–16 órás megvilágítás naponta,

— hőmérséklet: a fajtáknak megfelelő (lásd a 2. függeléket), de minden esetben ± 1 °C-on belül,

— az oldott oxigén koncentrációja: a kiválasztott hőmérsékleten a levegőtelítettségi érték nem kevesebb, mint 60 %-a,

— etetés: nincs.

A halakat meg kell vizsgálni az első 2–4 óra után, és legalább 24 órás időközönként. A halak akkor tekinthetők élettelennek, ha a farokúszó érintése nem vált ki reakciót, és nem látható semmilyen légzőmozgás. Az elpusztult halakat el kell távolítani, és ezt fel kell jegyezni. Nyilvántartást kell vezetni a látható rendellenességekről (például egyensúly-vesztés, az úszási viselkedés és a légzés változásai, pigmentáció stb.).

Naponta végre kell hajtani a pH-érték, az oldottoxigén-koncentráció és a hőmérséklet méréseit.

Határérték-vizsgálat

Az e módszerben leírt eljárások segítségével végrehajtható a határérték-vizsgálat 100 mg/l koncentrációval annak bemutatására, hogy az LC_{50} nagyobb, mint e koncentráció.

Ha az anyag olyan természetű, hogy nem érhető el a vizsgált vízben a 100 mg/l-es koncentráció, a határérték-vizsgálatot a használt közegben az anyag oldhatóságával egyenlő koncentrációval (vagy a stabil diszperziót alkotó maximális koncentrációval) kell végrehajtani (lásd még az 1.6.1.1. pontot is).

▼B

A határérték-vizsgálatot 7–10 hallal kell végrehajtani úgy, hogy a kontrollcsoportban lévő halak száma ezzel azonos legyen. (A binomiális elmélet szerint, amikor 10 hal alkalmazása mellett nem tapasztaltak halálozást, akkor 99,9 %-os a megbízhatósága annak, hogy az LC_{50} nagyobb, mint a határérték-vizsgálatban használt koncentráció. 7, 8 vagy 9 hal esetében a nulla halálozás legalább 99 %-os megbízhatóságot biztosít arra, hogy az LC_{50} nagyobb, mint az alkalmazott koncentráció).

Ha pusztulás következik be, a teljes vizsgálatot végre kell hajtani. Ha szubletális hatásokat figyelnek meg, ezeket fel kell jegyezni.

2. **ADATOK ÉS KIÉRTÉKELÉS**

Minden olyan időtartamhoz, amikor megfigyeléseket jegyeztek fel (24, 48, 72 és 96 óra), fel kell rajzolni a féllogaritmusos papírra az egyes javasolt expozíciós időtartamok során a koncentráció függvényében megállapított százalékos pusztulást.

Ha lehetséges, minden egyes megfigyelési időhöz meg kell becsülni az LC_{50}-et és a konfidenciahatárokat ($p = 0,05$) standard eljárások segítségével; ezen értékeket egy vagy legfeljebb két szignifikáns számjegyre kell kerekíteni (példák két számjegyre kerekítésre: a 173,5-ből 170; 0,127-ből 0,13; 1,21-ből 1,2 lesz).

Olyan esetekben, amikor a koncentráció/hatás görbe meredeksége túl nagy ahhoz, hogy lehetővé váljon az LC_{50} kiszámítása, elegendő ezen érték grafikus becslése.

Ha két, egymást követő koncentráció 2,2 arány mellett csak 0 és 100 %-os pusztulást ad, akkor ez a két érték elegendő azon tartomány jelzésére, amelybe az LC_{50} esik.

Ha megállapítható, hogy nem tartható fenn a vizsgált anyag stabilitása vagy homogenitása, ezt közölni kell a jelentésben, és körültekintően kell eljárni az eredmények értelmezésekor.

3. **JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— a kísérleti halakkal kapcsolatos információkat (tudományos név, törzs, szállító, mindenféle előkezelés, számuk és méretük az egyes vizsgált koncentrációkban),

— a hígítóvíz eredetét és fő kémiai jellemzőit (pH, keménység, hőmérséklet),

— alacsony vízoldékonyságú anyagok esetében a törzsoldat és vizsgált oldat elkészítésének módszerét,

— minden segédanyag koncentrációját,

— a használt koncentrációk jegyzékét és a vizsgált oldatban a vizsgált anyag koncentrációinál a stabilitással kapcsolatban rendelkezésre álló minden információt,

— kémiai elemzés esetén: a használt módszereket és kapott eredményeket,

— a határérték-vizsgálat eredményeit, adott esetben,

— az alkalmazott vizsgálati eljárás kiválasztásának indokait és részleteit (például statikus, félstatikus, adagolási sebesség, átfolyási sebesség, levegőztetett-e, egyedsűrűség stb.),

▼B

— a vizsgáló berendezés leírását,

— a világítási rendszert,

— a vizsgált oldatok oldottoxigén-koncentrációit, pH-értékeit és hőmérsékleteit, minden 24 órában,

— bizonyítékot arról, hogy teljesültek a minőségi követelmények,

— táblázatot, amely mutatja a kumulatív pusztulást minden egyes koncentráció és kontroll esetében (és ha szükséges, a segédanyagot tartalmazó kontroll esetében is) minden egyes javasolt megfigyelési időpontban,

— a koncentráció/hatás görbe grafikus ábrázolását a vizsgálat végén,

— ha lehetséges, az LC_{50}-értékeket minden egyes javasolt megfigyelési időpontban (95 %-os konfidenciahatárokkal),

— az LC_{50}-értékek meghatározására használt statisztikai eljárásokat,

— ha referenciaanyagot használnak, a kapott eredményeket,

— azt a legnagyobb vizsgált koncentrációt, amely még nem okoz pusztulást a vizsgálat időtartamában,

— azt a legalacsonyabb vizsgált koncentrációt, amely 100 %-os pusztulást okoz a vizsgálat időtartamában.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 203. vizsgálati irányelv, a Tanács határozata, C(81) 30 végleges és frissítések.

(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 90-303 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 für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (11) und 1 (15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 – Water – Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertabrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteenth edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolf, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen für die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, 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 biossay results. Water Res., 1970, vol. 4., 3–32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65–84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

1. függelék:

Művíz

Példa megfelelő hígítóvízre

Minden kémiai anyagnak analitikai tisztaságúnak kell lennie.

A víznek jó minőségű, desztillált víznek vagy 5 μScm^{-1}-nél kisebb vezetőképességű, ioncserélt víznek kell lennie.

A víz desztillálásához használt készüléknek semmilyen rézből készült alkatrészt nem szabad tartalmaznia.

Törzsoldatok:

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (kalcium-klorid-dihidrát): 11,76 g

Vízben kell feloldani, és vízzel 1 literre feltölteni.

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (magnézium-szulfát-heptahidrát): 4,93 g

Vízben kell feloldani, és vízzel 1 literre feltölteni.

$NaHCO_3$ (nátrium-hidrogén-karbonát): 2,59 g

Vízben kell feloldani, és vízzel 1 literre feltölteni.

KCl (kálium-klorid): 0,23 g

Vízben kell feloldani, és vízzel 1 literre feltölteni.

A hígításhoz használt művíz

A négy törzsoldat mindegyikéből 25 ml-t kell összekeverni, és vízzel 1 literre feltölteni.

A keveréket addig kell levegőztetni, amíg az oldott oxigén koncentrációja egyenlő nem lesz a levegőtelítettségi értékkel.

A pH-nak 7,8 ± 0,2-nek kell lennie.

Ha szükséges, a pH-t NaOH-val (nátrium-hidroxiddal) vagy HCl-dal (sósavval) kell beállítani.

Az így elkészített hígítóvizet 12 óráig állni kell hagyni, és nem szabad tovább levegőztetni.

Ezen oldatban a Ca- és Mg-ionok összege 2,5 mmol/liter. A Ca:Mg ionok aránya 4:1 és az Na:K ionok aránya 10:1. Ezen oldat teljes lúgossága 0,8 mmol/liter.

A hígítóvíz elkészítésekor nem szabad megváltoztatni a víz összetételét vagy tulajdonságait.

▼B

2. függelék:

A vizsgálathoz javasolt halfajták

Javasolt fajták	Javasolt vizsgálati hőmérséklet-tartomány (°C)	A kísérleti állatok javasolt összhosszúsága (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton–Buchanan) zebradánió	20-tól 24-ig	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) amerikai cselle	20-tól 24-ig	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) ponty	20-tól 24-ig	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poecilidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlegel 1850) japán fogasponty	20-tól 24-ig	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) guppi	20-tól 24-ig	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) kékkopoltyús naphal	20-tól 24-ig	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) szivárványos pisztráng	12-től 17-ig	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) jász	20-tól 24-ig	6,0 ± 2,0

Tenyésztés

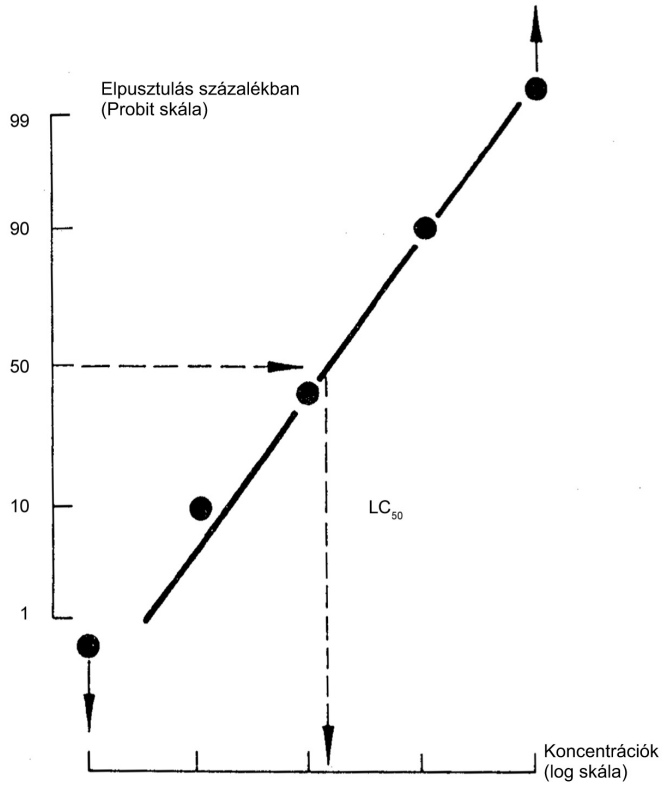
A fent felsorolt halakat könnyű tenyészteni és/vagy könnyen beszerezhetők az egész év során. Alkalmasak a tenyésztésre vagy halgazdaságokban, vagy laboratóriumban, betegség- és parazitakontrollált állapotok mellett úgy, hogy a kísérleti állatok egészségesek és ismert származásúak lesznek. E halak a világ számos részén rendelkezésre állnak.

▼B

3. függelék:

Példa koncentrációra: elpusztulás százalékban

Példa LC_{50} meghatározására féllogaritmusos papír segítségével



▼B

C.2. *DAPHNIA-FAJOK* AKUT IMMOBILIZÁCIÓS VIZSGÁLATA

1. MÓDSZER

Ez az akut immobilizációs vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 202 (2004) módszerrel.

1.1. BEVEZETÉS

Ez a módszer egy akut toxicitási vizsgálatot ír le, amely a vegyi anyagok Daphniákra gyakorolt hatását értékeli. Amennyire csak lehetett, meglévő vizsgálati módszereket alkalmaztunk (1) (2) (3).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Ezzel a módszerrel összefüggésben a következő meghatározásokat alkalmazzuk:

EC_{50}: az a becsült koncentráció, amely a Daphniák 50 %-át mozgásképtelenné teszi valamely meghatározott expozíciós időtartamon belül. Amennyiben más meghatározás kerül alkalmazásra, arról be kell számolni, a referenciájával együtt.

Mozgásképtelenség: Azokat az állatokat, amelyek a vizsgálati tartály óvatos megkeverése után 15 másodpercen belül nem képesek úszni, mozgásképtelennek kell tekinteni (még akkor is, ha a csápjaikat még tudják mozgatni).

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A fiatal Daphniákat, melyek a vizsgálat kezdetén 24 óránál fiatalabbak, a vizsgált anyag különböző koncentrációinak teszik ki 48 órás időtartamon át. Az immobilizálást 24 és 48 óra elteltével rögzítik, és összehasonlítják a kontrollértékekkel. Az eredményeket elemzik a 48 órás EC_{50} kiszámítása végett (lásd az 1.2. szakaszt a meghatározásokról). A 24 órás EC_{50} meghatározása opcionális.

1.4. INFORMÁCIÓ A VIZSGÁLATI ANYAGRÓL

Ismerni kell a vizsgált anyag vízoldékonyságát és gőznyomását, és a vizsgálati oldatokban lévő anyag mennyiségi meghatározásához rendelkezni kell egy olyan megbízható analitikai módszerrel, amelynél ismert a visszanyerési hatékonyság és meghatározás korláta. A hasznos információk közé tartozik a szerkezeti képlet, az anyag tisztasága, vízben való stabilitása vagy fénystabilitása, a P_{ow} és a gyors biológiai lebonthatóságra vonatkozó vizsgálat eredményei (lásd C.4. módszer).

Megjegyzés: A fizikai, kémiai tulajdonságaik miatt nehezen vizsgálható anyagok vizsgálatának útmutatóját a 4. szakasz tartalmazza.

1.5. REFERENCIAANYAGOK

Az EC_{50} vizsgálata referenciaanyagra is elvégezhető a vizsgálati körülmények megbízhatóságának biztosítására. Erre a célra a nemzetközi körvizsgálatokban (1) (5) használt mérgező anyagok javasoltak ([1]). A referenciaanyagos vizsgálato(ka)t lehetőleg havonta, és évente legalább kétszer kell elvégezni.

([1]) E laboratóriumközi vizsgálatok eredményei és az ISO 6341 technikai kiigazítása szerint a kálium-dikromát ($K_2Cr_2O_7$) 24 órás EC_{50} értéke a 0,6 mg/l–1,7 mg/l tartományban található.

▼B

1.6. MINŐSÉGI KRITÉRIUMOK

A vizsgálat érvényességéhez az alábbi teljesítménykritériumoknak kell teljesülniük:

— A kontrollokban, beleértve az szolubilizálószert tartalmazó kontrollt, a Daphniák immobilizálási aránya nem haladhatja meg a 10 %-ot,

— A vizsgálat végéig az oldott oxigén koncentrációja legyen ≥ 3 mg/l a kontrollban és a vizsgálati tartályokban.

Megjegyzés: Az első kritérium esetében a kontroll-Daphniák legfeljebb 10 %-a lehet mozgásképtelen, illetve mutathatja kór vagy stressz más jeleit, például elszíntelenedést, szokatlan viselkedést, mint például a víz felszínére szorulást.

1.7. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.7.1. **Berendezés**

A vizsgálati tartályoknak és más, a vizsgált oldatokkal érintkezésbe kerülő berendezések teljes mértékben üvegből vagy más, kémiailag inert anyagból kell készülniük. A vizsgálati tartályok rendszerint üveg kémcsövek vagy főzőpoharak; ezeket minden egyes használatot megelőzően szabványos laboratóriumi eljárással meg kell tisztítani. A vizsgálati tartályokat lazán le kell fedni, csökkentve a párolgásos vízvesztést, és megakadályozva a por oldatokba való kerülését. Az illékony anyagokat olyan, teljesen megtöltött zárt tartályokban kell vizsgálni, amelyek elegendően nagyok az oxigénhiány vagy a túl alacsony oxigénszint megakadályozásához (lásd az 1.6. szakaszt és az 1.8.3. szakasz első bekezdését).

Emellett a következő berendezések vagy azok mindegyike alkalmazandó: oxigénmérő (mikroelektródával, vagy egyéb olyan berendezéssel, amely alkalmas az oldott oxigén mérésére kis térfogatú mintákban); pH-mérő; megfelelő készülék a hőmérséklet szabályozásához; a teljes szerves szénkoncentráció (TOC) meghatározására szolgáló berendezés; a kémiai oxigénigény (KOI) meghatározására szolgáló berendezés; vízkeménység meghatározására szolgáló berendezés, stb.

1.7.2. **Vizsgált szervezetek**

A vizsgálat során a *Daphnia magna* Straus kísérleti állatfajt kell előnyben részesíteni, jóllehet más megfelelő Daphnia-fajok is (pl. *Daphnia pulex)* használhatóak. A vizsgálat kezdetén az állatoknak 24 óránál fiatalabbnak kell lenniük, és a variációs képesség csökkentése érdekében erősen javasolt, hogy ne az első szaporulatból származzanak. Egészséges törzstenyészetből kell származniuk (azaz nem szabad stressz jeleit mutatniuk, ilyen például magas halálozás, hímek és ephippiumok jelenléte, az első szaporulat késedelme, színtelen állatok, stb.). Egy adott vizsgálathoz felhasznált összes szervezet származzon ugyanabból a Daphnia-állományból létrehozott tenyészetből. Az állomány állatait olyan tenyésztési körülmények között kell tartani (fény, hőmérséklet, közeg), mint amelyeket a vizsgálatban használnak. Amennyiben a Daphniák vizsgálatban alkalmazandó tenyésztési közege különbözik a rutin Daphnia-tenyészetben használttól, a helyes gyakorlat az, ha a vizsgálat előtt akklimatizációs időszakot iktatnak be. Erre a célra a tenyésztett Daphniákat a vizsgálat kezdetét megelőzően legalább 48 órán keresztül vizsgálati hőmérsékletű hígítóvízben kell tartani.

▼B

1.7.3. **Tenyésztővíz és hígítóvíz**

Tenyésztő- és hígítóvízként természetes víz (felszíni vagy talajvíz), művíz vagy klórtalanított csapvíz fogadható el, amennyiben a Daphniák a tenyésztés, akklimatizálódás és vizsgálat időtartama alatt abban életben maradnak anélkül, hogy stressz jeleit mutatnák. Bármely olyan víz, amely megfelel az elfogadható hígítóvíz 1. függelékben felsorolt kémiai tulajdonságainak, megfelel vizsgálati víznek. A vizsgálat időtartama alatt a víz minősége legyen állandó. Művíz készíthető analitikai tisztaságú reagensek meghatározott mennyiségének deionizált vagy desztillált vízhez történő hozzáadásával. Művíz példáit az (1) és (6) pont, illetve a 2. függelék adja meg. Meg kell jegyezni, hogy fémtartalmú vizsgált anyag esetében kerülendőek az ismert kelátképző anyagok, mint a 2. függelékben említett M4 és M7 közegek. A pH-érték legyen 6–9 közötti tartományban. A *Daphnia Magna* esetében 140 és 250 mg/l ($CaCO_3$-ban) közti keménység ajánlott, míg más *Daphnia-fajok* esetében alacsonyabb keménység is megfelelő lehet. A hígítóvizet a vizsgálatra történő felhasználás előtt levegőztetni lehet, hogy az oxigénkoncentráció elérje a telítettséget.

Természetes víz használatakor a minőségi paramétereket évente legalább kétszer mérni kell, illetve bármikor, ha felmerül annak a gyanúja, hogy ezek a tulajdonságok jelentős mértékben megváltozhattak (lásd az előző bekezdést és az 1. függeléket). Nehézfém-méréseket (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) is végezni kell. Klórmentesített csapvíz használata esetén kívánatos a napi klórelemzés. Amennyiben a hígítóvíz felszíni vagy talajvízforrásból származik, mérni kell a vezetőképességet, az összes szerves széntartalmat (TOC) vagy a kémiai oxigénigényt (KOI).

1.7.4. **Vizsgálati oldatok**

A kiválasztott koncentrációjú vizsgálati oldatokat rendszerint törzsoldat hígításával készítik. A törzsoldatokat lehetőleg a vizsgálati anyagnak a hígítóvízben történő feloldásával kell elkészíteni. Az oldószerek, emulgeálószerek vagy diszpergálószerek használatát lehetőleg kerülni kell. Ugyanakkor bizonyos esetekben szükség lehet ezekre a szerekre a megfelelő koncentrációjú törzsoldat készítéséhez. A megfelelő oldószerek, emulgeálószerek és diszpergálószerek példáit a (4) pont sorolja fel. A vizsgálati oldatban lévő vizsgálati anyag mindenestre nem haladhatja meg a hígítóvízben való oldhatóság határértékét.

A vizsgálatot a pH-érték beállítása nélkül kell végezni. Ha a pH-érték nem marad a 6–9 értékek tartományában, újabb vizsgálat végezhető, amelynél a törzsoldat pH-értékét a hígítóvíz pH-értékére kell beállítani a vizsgálati anyag hozzáadása előtt. A pH-beállítást úgy kell elvégezni, hogy a törzsoldat-koncentrációja ne változzon jelentős mértékben, és a vizsgálati anyag ne lépjen kémiai reakcióba más anyaggal, vagy ne csapódjon ki. Erre a célra a HCl vagy az NaOH javasolt.

▼B

1.8. ELJÁRÁS

1.8.1. **Expozíciós körülmények**

1.8.1.1. *Vizsgálati csoportok és kontrollok*

A vizsgálati tartályokat megfelelő mennyiségű hígítóvízzel és a vizsgálati anyag oldataival kell feltölteni. A tartályokban a levegő/víz aránya legyen azonos a vizsgálati és a kontrollcsoport esetében. Ezután a Daphniákat bele kell helyezni a vizsgálati tartályokba. Minden egyes vizsgálati koncentrációban és a kontrollokban legalább 20 állatot kell használni – lehetőleg négy, egyenként öt állatot tartalmazó csoportra osztva. Állatonként legalább 2 ml vizsgálati oldatot kell biztosítani (azaz vizsgálati tartályonként 10 ml mennyiséget öt Daphniára). A vizsgálat elvégezhető félstatikus vagy átfolyásos rendszerben is, ahol a vizsgált anyag koncentrációja nem állandó.

A kezelt sorozatok mellett egy hígítóvizes kontrollcsoport-sorozatot és – adott esetben – egy, az oldószert tartalmazó kontrollcsoport-sorozatot kell beállítani.

1.8.1.2. *Vizsgálati koncentrációk*

A végleges vizsgálat koncentrációtartományának meghatározására behatároló vizsgálat végezhető, hacsak rendelkezésre nem állnak a vizsgálati anyag toxicitásra vonatkozó információk. E célból a Daphniákat a vizsgálati anyag szélesen változó koncentrációinak teszik ki. Minden egyes vizsgálati koncentrációnak öt Daphniát kell kitenni, 48 óráig vagy rövidebb ideig, és párhuzamosokra nincs szükség. Az expozíciós idő csökkenthető (pl. 24 óra vagy kevesebb), ha a behatároló vizsgálat céljainak megfelelő adatok rövidebb idő alatt megszerezhetők.

Legalább öt vizsgálati koncentrációt használjunk. Ezeket szétválasztási tényezővel mértani sorba kell beállítani, lehetőség szerint nem meghaladva a 2,2 értéket. Ötnél kevesebb koncentráció alkalmazása esetén indoklás szükséges. A legmagasabb vizsgált koncentráció eredményezzen lehetőleg 100 százalékos immobilizációt, a legalacsonyabb vizsgált koncentráció pedig lehetőleg ne okozzon megfigyelhető hatást.

1.8.1.3. *Inkubációs körülmények*

A hőmérséklet legyen 18 °C és 22 °C közötti tartományban, és minden egyes vizsgálatnál ± 1 °C eltéréssel legyen állandó. 16 órás világos, és 8 órás sötét ciklus javasolt. A teljes sötétség is elfogadható, főleg fényben instabil vizsgálati anyagok esetében.

A vizsgálati tartályokat a vizsgálat alatt nem szabad levegőztetni. A vizsgálatot a pH-érték módosítása nélkül kell végezni. A Daphniákat a vizsgálat alatt nem szabad etetni.

1.8.1.4. *Időtartam*

A vizsgálat időtartama 48 óra.

1.8.2. **Megfigyelések**

24 és 48 órával a vizsgálat megkezdését követően minden vizsgálati tartályban ellenőrizni kell a mozgásképtelen Daphniákat (lásd az 1.2. szakaszt a meghatározásokról). A mozgásképtelenség mellett minden rendellenes viselkedésről vagy jelenségről be kell számolni.

▼B

1.8.3. **Analitikai mérések**

A vizsgálat kezdetekor és a végén a kontroll(ok)ban és a vizsgálati anyag legnagyobb koncentrációjában mérni kell az oldott oxigén koncentrációját és a pH-értéket. A kontrollokban az oldott oxigén koncentrációja feleljen meg az érvényességi kritériumnak (lásd az 1.6. szakaszt). A pH-értéknek rendes körülmények között egyik vizsgálatban sem szabad 1,5 egységet meghaladó mértékben változnia. A hőmérsékletet rendszerint kontrolltartályokban vagy környezeti levegőben mérik, és a vizsgálat során lehetőleg folyamatosan rögzíteni kell, de legalább a vizsgálat kezdetekor és végén.

A vizsgálati anyag koncentrációját legalább a legnagyobb és legkisebb vizsgálati koncentrációnál kell mérni a vizsgálat kezdetekor és végén (4). Javasolt, hogy az eredmények a mért koncentrációkon alapuljanak. Ugyanakkor, ha megfelelő bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a vizsgált anyag koncentrációját a vizsgálat során sikerült mindvégig a névleges vagy kiindulási koncentráció ± 20 %-os sávján belül tartani, akkor az eredményeket a névleges vagy a mért kiindulási értékekre is lehet alapozni.

1.9. HATÁRÉRTÉK-VIZSGÁLAT

Az e módszerben leírt eljárások segítségével 100 mg/l vizsgálati anyaggal vagy a vizsgálati közegben való oldhatósági határig (amelyik alacsonyabb) határérték-vizsgálat hajtható végre annak bizonyítására, hogy az EC_{50} nagyobb, mint e koncentráció. A határérték-vizsgálatot 20 Daphnia használatával (lehetőleg négy darab ötös csoportra osztva) kell végrehajtani úgy, hogy a kontrollcsoportban lévő állatok száma ezzel azonos legyen. Ha mozgásképtelenség következik be, a teljes vizsgálatot el kell végezni. Minden megfigyelt rendellenes viselkedést rögzíteni kell.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, minden egyes kezelési csoport és kontroll esetében feltüntetve a felhasznált Daphniák számát, és minden megfigyelt mozgásképtelenséget. A 24 órás és 48 órás immobilizált százalékokat a vizsgálati koncentrációk függvényében kell feltüntetni egy grafikonon. A görbék meredekségének és az EC_{50} 95 %-os konfidenciaszinten ($p = 0,05$) történő kiszámításához az adatokat megfelelő statisztikai módszerekkel elemezzük (pl. probit-elemzés, stb.) (7) (8).

Ahol az EC_{50}-számítás standard módszerei nem alkalmazhatóak a kapott adatokra, az immobilitást nem okozó legmagasabb koncentrációt és a 100 % immobilizációt eredményező legkisebb koncentrációt kell használni az EC_{50} becsléséhez (amely a két koncentráció mértani közepének számít).

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati anyag:

— fizikai jellege és fontos fizikai-kémiai tulajdonságai,

▼B

— kémiai azonosítási adatok, beleértve a tisztaságot.

Vizsgált fajok:

— Daphniák faja és eredetük, szállító (ha ismert) és az alkalmazott tenyésztési körülmények (beleértve a forrást, táplálék fajtáját és mennyiségét, az etetés gyakoriságát).

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgálati tartályok leírása: a tartály típusa, az oldat térfogata, a Daphniák száma vizsgálati tartályonként, a vizsgálati tartályok száma (ismétlések) koncentrációnként,

— a törzsoldat és a vizsgált oldat elkészítésének módszere, beleértve bármilyen oldószer vagy diszpergálószer használatát, az alkalmazott koncentrációkat,

— a hígítóvíz adatai: forrás és vízminőségi jellemzők (pH-érték, keménység, Ca/Mg-arány, Na/K-arány, lúgosság, vezetőképesség, stb.); a művíz összetétele, amennyiben alkalmazták,

— inkubációs körülmények: hőmérséklet, fényintenzitás és periodicitás, oldott oxigén, pH-érték, stb.

Eredmények:

— az immobilizált vagy más káros behatást mutató (beleértve a rendellenes viselkedést) Daphniák száma és százaléka a kontrollokban és az egyes kezelt csoportokban, minden egyes megfigyelési időpontban, és a megfigyelt hatások jellegének leírása,

— ha rendelkezésre áll, a referenciaanyaggal végzett vizsgálat eredményei és dátuma,

— a névleges vizsgálati koncentrációk és a vizsgálati tartályokban lévő vizsgálati anyagok koncentrációinak meghatározására végzett valamennyi analízis eredménye; a módszer visszanyerési hatékonyságáról és a meghatározás korlátjáról is beszámolva,

— vizsgálat során végzett összes hőmérsékletre, pH-értékre és oldott oxigénre vonatkozó fizikai-kémiai mérés,

— immobilizációs EC_{50} 48 óránál, konfidenciaintervallumokkal, és a számításaikhoz használt illesztett modellek grafikonjai, a dózisreakció-görbék meredeksége, és standard hibája; az EC_{50} meghatározásához használt statisztikai eljárások; (ha mérték, ezeket az adatokat a 24 órás immobilizálásra is meg kell adni)

— a vizsgálati módszertől való bármilyen eltérés magyarázata, illetve annak magyarázata, hogy az eltérés befolyásolta-e a vizsgálati eredményeket.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(1) ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) – Acute toxicity test. Third edition, 1996.

(2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

(3) Environment Canada. (1996). Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

(4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

(5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

(6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

(7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 – American Society for Testing and Materials. p. 65–84.

(8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

1. függelék

AZ ELFOGADHATÓ HÍGÍTÓVÍZ NÉHÁNY KÉMIAI TULAJDONSÁGA

Anyagok	Koncentráció
Szemcsés anyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 mg/l
Ionizálatlan ammónia	<1 µg/l
Maradék klór	<10 µg/1
Összes szerves foszfort tartalmazó növényvédő szer	<50 µg/1
Összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer plusz poliklórozott bifenilek	<50 ng/1
Összes szerves klór	<25 ng/1

▼B

2. függelék

MEGFELELŐ VIZSGÁLATI MŰVÍZRE VONATKOZÓ PÉLDÁK

ISO vizsgálati víz (1)

Törzsoldatok (egyetlen anyag)		A művíz elkészítéséhez 1 liter vízhez a következő mennyiségű törzsoldatot kell adni
Anyagok	1 liter vízhez adott mennyiség (*)	
Kalcium-klorid $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Magnézium-szulfát $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Nátrium-bikarbonát $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Kálium-klorid KCl	0,23 g	25 ml

(*) Megfelelő tisztaságú víz, pl. deionizált, desztillált vagy fordított ozmózissal előállított víz, amelynek vezetőképessége lehetőleg nem haladja meg a 10 μS cm^{-1}-t.

Elendt M7 és M4 közeg

Akklimatizálás az Elendt M4 és M7 közeghez

Egyes laboratóriumok nehézségekbe ütköztek, amikor Daphniákat M4 és M7 közegbe próbáltak átvinni. Fokozatos akklimatizálással, azaz a saját közegből előbb 30, majd 60, végül 100 százalékos Elendt-közegbe való áthelyezéssel azonban sikerült némi sikert elérni. Az akklimatizálódás akár egy hónapig is eltarthat.

Előkészítés

Nyomelem

Először megfelelő tisztaságú (azaz deionizált, desztillált vagy reverz ozmózissal előállított) víz felhasználásával egyedi nyomelemeket tartalmazó, különféle törzsoldatokat (I) kell készíteni. Ezekből a különböző törzsoldatokból (I) egy második, egyetlen (II) törzsoldat készül, amely az összes nyomelemet tartalmazza (kombinált oldat), azaz:

I. törzsoldat(ok) (egyes anyagokból)	A vízhez adott mennyiség (mg/l)	Koncentráció (M4 közegre vonatkoztatv a)	A II. kombinált törzsoldat elkészítéséhez az I. törzsoldatból az alábbi mennyiséget kell vízhez hozzáadni (ml/l)	
			M4	M7
H_3 BO_3	57 190	20 000-szeres	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000-szeres	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-szeres	1,0	0,25

▼B

I. törzsoldat(ok) (egyes anyagokból)	A vízhez adott mennyiség (mg/l)	Koncentráció (M4 közegre vonatkoztatv a)	A II. kombinált törzsoldat elkészítéséhez az I. törzsoldatból az alábbi mennyiséget kell vízhez hozzáadni (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000-szeres	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000-szeres	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-szeres	1,0	0,25
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000-szeres	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000-szeres	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-szeres	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000-szeres	1,0	1,0
KI	65	20 000-szeres	1,0	1,0
$Na_2\ SeO_3$	43,8	20 000-szeres	1,0	1,0
$NH_4\ VO_3$	11,5	20 000-szeres	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2 000-szeres	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000-szeres	—	—
Mind a Na_2EDTA, mind a $FeSO_4$-oldatot külön kell elkészíteni, majd összeönteni és azonnal autoklávban kezelni.				
Ebből:				
2 l Fe-EDTA oldat		1 000-szeres	20,0	5,0

M4 és M7 közeg

Az M4 és M7 közegeket a II. törzsoldatból, a makroelemekből és a vitaminokból kell elkészíteni a következőképpen:

	A vízhez adott mennyiség (mg/l)	Koncentráció (M4 közegre vonatkoztatva)	A közeg készítésekor hozzáadott II. törzsoldat mennyisége (ml/l)	
			M4	M7
II. törzsoldat (kombinált nyomelemek)		20-szoros	50	50
Makroelemek törzsoldatai (egy anyagból)				
$CaCl_2 \cdot 2H_20$	293 800	1 000-szeres	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000-szeres	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-szeres	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-szeres	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000-szeres	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-szeres	0,1	0,1
$KH_2\ PO_4$	1 430	10 000-szeres	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-szeres	0,1	0,1

▼B

	A vízhez adott mennyiség (mg/l)	Koncentráció (M4 közegre vonatkoztatva)	A közeg készítésekor hozzáadott II. törzsoldat mennyisége (ml/l)	
			M4	M7
Kombinált vitamintörzsoldat	—	10 000-szeres	0,1	0,1
A kombinált vitamintörzsoldat készítéséhez 3 vitamint kell 1 liter vízhez adni, a következőképpen:				
Tiamin-hidroklorid	750	10 000-szeres		
Ciano-kobalamine (B_{12})	10	10 000-szeres		
Biotin	7,5	10 000-szeres		

A kombinált vitamintörzsoldatot kis aliquot részletekben, fagyasztott állapotban kell tartani. A közeghez a vitaminokat röviddel a felhasználás előtt kell hozzáadni.

Megjegyzés: A végleges közeg elkészítésekor a sók kicsapódásának elkerülése érdekében az aliquot törzsoldatokat kb. 500–800 ml deionizált vízhez kell adni, majd a mennyiséget fel kell tölteni 1 literre.

Megjegyzés: Az M4 tényészoldatról szóló első publikáció az Elendt, B.P. (1990)-ben található. Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154., pp. 25–33.

▼M6

C.3. SZAPORODÁSGÁTLÁSI VIZSGÁLAT, ÉDESVÍZI ALGÁK ÉS CIANOBAKTÉRIUMOK

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 201. vizsgálati iránymutatásában (2006, a melléklet 2011-ben korrigálva) leírt módszerrel. Megállapították, hogy a vizsgálati módszert további fajokra is ki kell terjeszteni és frissíteni kell, hogy eleget tegyen a vegyületekkel szemben támasztott kockázatértékelési és besorolási követelményeknek. A módszer átdolgozása a kiterjedt gyakorlati tapasztalatok, az algákra ható toxicitás vizsgálatának területén végbement tudományos fejlődés és a módszer eredeti elfogadása óta folyamatban lévő széles körű hatósági alkalmazás tapasztalatai alapján történt.

2. Az alkalmazott fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

3. A vizsgálat célja egy adott vegyi anyag által az édesvízi mikroalgákra és/vagy cianobaktériumokra gyakorolt hatás meghatározása. A vizsgált vegyi anyagnak exponenciálisan szaporodó organizmusokat teszünk ki egyszeres (batch) tenyészetekben, szokásosan 72 órán keresztül. A viszonylag rövid vizsgálati időtartam ellenére több generációra kiterjedő hatások vizsgálhatók.

4. A rendszerben fellépő válasz a szaporodás visszaesése a vizsgált vegyi anyag különböző koncentrációinak kitett algatenyészetekben (kísérleti egységek). A választ a koncentráció függvényében értékeljük, összehasonlítva a szaporodást az párhuzamos, nem kezelt kontrolltenyészetekben észlelt szaporodással. A toxikus hatásra adott válasz teljes kibontahozásához (optimális érzékenység) a tenyészetek számára – megfelelő tápkörülmények és folyamatos világítás mellett – lehetővé kell tenni a korlátlan exponenciális szaporodást elegendően hosszú ideig ahhoz, hogy mérni lehessen a fajlagos szaporodási sebesség csökkenését.

5. A szaporodás és a szaporodásgátlás mennyiségi meghatározásához az alga élőanyagtömegét mérjük az idő függvényében. Az élőanyag mennyisége definíció szerint száraz tömeg/térfogat, pl. mg alga/liter tápoldat. A száraz tömeg mérése azonban bonyolult, ezért helyettesítő paraméterek használatosak. Ezek közül a sejtszám a leggyakrabban használt paraméter. További helyettesítő paraméterek lehetnek a sejttérfogat, a fluoreszcencia, az optikai sűrűség stb. A mért helyettesítő paraméterek és az élőanyagtömeg közötti átszámítási tényezőt ismerni kell.

6. A kísérlet végpontja a szaporodás gátlása, az élőanyagtömeg expozíciós idő alatti növekedésének logaritmikusaként kifejezve (átlagos fajlagos szaporodási sebesség). A kísérleti oldatsorozattal mért átlagos fajlagos szaporodási sebességekből meg kell határozni azt a koncentrációt, amely a szaporodási sebességet adott x %-os (pl. 50 %-os) mértékben gátolja, és azt E_rC_x-ként (pl. E_rC_{50}) kell kifejezni.

7. Az eljárás másik hatásváltozója a szaporulat, amelyre bizonyos országok esetében a jogszabályi követelmények teljesítéséhez lehet szükség. A szaporulat definíció szerint az expozíciós idő végén és az expozíciós idő kezdetén meglévő élőanyag tömegének különbsége. A vizsgálati oldatok tekintetében egyenként kiszámított szaporulatok alapján meghatározzuk azt az E_yC_x (például E_yC_{50}) koncentrációt, amely egy adott x %-os (például 50 %-os) növekedésgátlást idéz elő.

8. Statisztikai eljárással meghatározható továbbá az észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció (LOEC) és az észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC) értéke is.

▼M6

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

9. A kísérleti körülmények kialakításához hasznosak lehetnek egyes információk a vizsgált vegyi anyagról, mint pl. szerkezeti képlet, tisztaság, fényérzékenység, stabilitás a kísérleti körülmények között, fényabszorpciós tulajdonságok, pKa és az átalakulási vizsgálatok eredményei, beleértve a biológiai lebonthatóságot vízben.

10. A vízben való oldhatóságot, az oktanol-víz megoszlási hányadost (P_{ow}) és a vizsgált vegyi anyag gőznyomását ismerni kell, valamint rendelkezésre kell állnia egy, a kísérleti oldatban jelen lévő vegyi anyag mennyiségi meghatározására alkalmas validált módszernek, dokumentált visszanyerési hatékonysággal és kimutatási határral.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

11. A vizsgálat érvényességéhez a következő kritériumoknak kell teljesülniük:

— A kontrolltenyészetekben a élőanyag mennyiségének exponenciálisan kell növekednie, legalább 16-szorosára a 72-órás kísérleti idő alatt. Ez 0,92 nap^{-1}-es fajlagos szaporodási sebességnek felel meg. A leggyakrabban használt fajoknál a szaporodási sebesség rendszerint jelentősen nagyobb ennél (lásd a 2. függeléket). Ez a kritérium az 2. függelékben felsoroltaknál lassabban szaporodó fajok alkalmazása esetében nem feltétlenül teljesül. Ebben az esetben a kísérleti időt meg kell hosszabbítani, hogy legalább 16-szoros szaporodást kapjunk a kontrolltenyészetekben úgy, hogy a szaporodás mindvégig exponenciális marad a kísérlet ideje alatt. A kísérlet ideje lerövidíthető (de legalább 48 órának kell lennie), hogy a korlátlan exponenciális szaporodás a kísérlet alatt végig fennálljon, feltéve hogy megmarad a legalább 16-szoros szaporodás.

— A szakaszonkénti (0–1., 1–2. és 2–3. nap a 72 órás kísérletnél) fajlagos szaporodási sebesség átlagos variációs együtthatója a kontrolltenyészeteknél (lásd a „variációs együttható”-t az 1. függelékben) nem haladhatja meg a 35 %-ot. A szakaszonkénti fajlagos szaporodási sebesség kiszámítására vonatkozóan lásd a 49. pontot. Ez a kritérium a kontroll ismétlésekre számított variációs együttható átlagértékére vonatkozik.

— Az átlagos fajlagos szaporodási sebesség variációs együtthatója a kísérleti idő alatt a kontroll ismétlésekben semmikor sem haladhatja meg a 7 %-ot a *Pseudokirchneriella subcapitata* fajjal és *Desmodesmus subspicatus* fajjal folytatott vizsgálatokban. A többi, kevésbé gyakran vizsgált faj esetében ez az érték nem lehet nagyobb 10 %-nál.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

12. A vizsgálati eljárás referencia-vegyianyag(ok), mint például a nemzetközi körvizsgálatban (1) alkalmazott 3,5-diklór-fenol segítségével ellenőrizhető. A kálium-dikromát szintén használható referencia-vegyianyagként, zöldalgák esetében. Tanácsos legalább kétszer egy évben tesztelni a referencia-vegyianyagot.

A VIZSGÁLAT ALKALMAZHATÓSÁGA

13. Ez a vizsgálati módszer legegyszerűbben olyan vízoldható vegyi anyagokra használható, amelyek a vizsgálati körülmények között valószínűleg a vízben maradnak. Az illékony, erősen adszorbeálódó, színes, vízben rosszul oldódó,

▼M6

esetleg a tápoldatban lévő tápanyagok vagy ásványi anyagok felvételére hatással lévő vegyi anyagok esetében szükség lehet a leírt módszer bizonyos módosítására (pl. zárt rendszer, a vizsgálathoz használt edények kondicionálása). Néhány megfelelő módosításhoz útmutatás található a (2), (3) és (4) szakirodalmi hivatkozásban.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

14. A vizsgálathoz használt edények és minden más, a vizsgálati oldatokkal közvetlenül érintkező más felszerelések üvegből vagy más, kémiailag közömbös anyagból készüljenek. Alaposan át kell mosni őket, biztosítandó, hogy szerves vagy szervetlen szennyezések ne befolyásolhassák az algák szaporodását, vagy a tápoldat összetételét.

15. A vizsgálathoz használt edények általában olyan méretű üveglombikok legyenek, amelyek a vizsgálat során végzett mérésekhez képesek megfelelő térfogatú tenyészetet befogadni, és biztosítják a kívánt mértékű CO_2-átadást a környezeti levegőből (lásd a 30. pontot). Figyelni kell arra, hogy a folyadéktérfogat elegendő legyen az analitikai meghatározások elvégzéséhez (lásd a 37. pontot).

16. Szükséges lehet továbbá néhány vagy az összes az alábbi eszközök közül:

— Tenyésztőberendezés: tenyésztőszekrény vagy -fülke ajánlott, amelyekben a választott inkubációs hőmérsékletet ±2 °C pontossággal tartható.

— Fénymérő berendezés: fontos megjegyezni, hogy a fényerő mérési módszere, és főleg az érzékelő (kollektor) típusa hatással lehet a mért értékre. A mérésekhez gömb alakú (4 π) érzékelő (amely a mérési sík alatti és feletti bármely szögből érkező közvetlen és visszavert fényre reagál), vagy félgömb alakú (2 π) érzékelő (amely a mérési sík feletti bármely szögből érkező fényre reagál) használata preferált.

— Az alga élőanyagtömegének meghatározására alkalmas berendezés. Az sejtszámlálás, amely az alga élőanyagtömeg mérésére leggyakrabban használt helyettesítő módszer, elvégezhető elektronikus részecskeszámláló, számlálókamrával ellátott mikroszkóp, vagy áramlásos citométer segítségével. Más helyettesítő paraméterek mérhetők áramlásos citométerrel, fluoriméterrel, spektrofotométerrel vagy koloriméterrel. Célszerű kiszámítani a sejtszám és a száraz tömeg közötti átszámítási tényezőt. Spektrofotométer használata esetén szükséges lehet legalább 4 cm fényúttal rendelkező küvetták használatára, hogy a módszer kis élőanyag-koncentrációknál is használható méréseket szolgáltasson.

A vizsgálathoz használt organizmusok

17. A nem kitapadó mikroalgák és cianobaktériumok több faja használható. A 2. függelékben felsorolt törzsekről már bizonyították, hogy megfelelően használhatók ennek a vizsgálati módszernek az eljárásai során.

18. Más faj használata esetén a törzset és/vagy az eredetet dokumentálni kell. Igazolni kell, hogy a vizsgálathoz kiválasztott alga exponenciális szaporodása a kísérlet ideje alatt mindvégig fennmarad az adott körülmények között.

Tápoldat

19. Két választható tápoldat, az OECD-tápoldat és az AAP-tápoldat ajánlott. Ezeknek a tápoldatoknak az összetétele a 3. függelékben látható. Figyelembe kell venni, hogy a két tápoldat kiindulási pH-értéke és pufferkapacitása (a pH-növekedés szabályozása) eltérő. Ennek megfelelően az alkalmazott tápoldattól függően a vizsgálati eredmények különbözőek lehetnek, kiváltképp ionizáló vegyi anyagok vizsgálata során.

▼M6

20. Bizonyos célokhoz (pl. fémek és kelátképző szerek vizsgálatakor, vagy ha a kísérlet különböző pH-értékeken történik) a tápoldat módosítására lehet szükség. A módosított tápoldat használatát részletesen ismertetni és indokolni kell (3)(4).

Kiindulási élőanyag-koncentráció

21. A kiindulási élőanyagnak minden vizsgált tenyészetben ugyanannyinak és megfelelően kevésnek kell lennie, hogy exponenciálisan növekedhessen végig az expozíciós idő alatt, a tápanyagok elfogyásának veszélye nélkül. A kiindulási élőanyag mennyisége nem lépheti túl a 0,5 mg száraz tömeg/l értéket. Az alábbi kiindulási sejtkoncentrációk ajánlottak:

Pseudokirchneriella subcapitata:	$5 \times 10^3 - 10^4$ sejt/ml
Desmodesmus subspicatus	$2–5 \times 10^3$ sejt/ml
Navicula pelliculosa	10^4 sejt/ml
Anabaena flos-aquae	10^4 sejt/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 - 10^5$ sejt/ml

A vizsgált vegyi anyag koncentrációi

22. Az a koncentrációtartomány, amelyben a hatások valószínűleg fellépnek, koncentrációtartomány-meghatározási vizsgálatok eredményei alapján állapítható meg. A végleges meghatározó vizsgálathoz legalább öt, egy 3,2-nél nem nagyobb kvóciensű mértani sorozat szerinti koncentrációt kell kiválasztani. Olyan vegyi anyagok esetében, ahol a koncentráció-válasz görbe lapos, nagyobb kvóciens használata lehet indokolt. A koncentrációsorozatnak lehetőleg az algaszaporodási sebesség 5–75 %-os gátlását okozó tartományt kell lefednie.

Ismétlések és kontrolltenyészetek

23. A vizsgálatot úgy kell megtervezni, hogy minden vizsgált koncentrációra három ismétlést tartalmazzon. Ha az NOEC meghatározása nem követelmény, a vizsgálat ettől eltérő lehet úgy, hogy a koncentrációk száma nagyobb lesz, az egy koncentrációhoz tartozó ismétlések száma pedig kisebb. A kontroll ismétlések számának legalább háromnak kell lennie, és ideálisan kétszer annyinak, mint az egyes vizsgált koncentrációkhoz tartozó ismétlések száma.

24. Külön oldatsorozatot lehet készíteni a vizsgált vegyi anyag koncentrációinak analitikai meghatározásához (lásd a 36. és 38. pontot).

25. Ha a vizsgált vegyi anyag oldhatóvá tételéhez oldószert kell használni, akkor a vizsgálatnak további kontrolltenyészeteket is tartalmaznia kell, amelyekben az oldószernek ugyanabban a koncentrációban kell jelen lennie, mint a vizsgált tenyészetekben.

Az oltótenyészet elkészítése

26. A tápoldattal 2–4 nappal a kísérlet kezdete előtt oltótenyészetet kell készíteni, hogy a vizsgált algák hozzászokjanak a kísérleti körülményekhez, és hogy exponenciális szaporodási fázisban legyenek a kísérleti oldatok beoltásakor. Az alga élőanyag-mennyiségét úgy kell beállítani, hogy a kísérlet kezdetéig az exponenciális szaporodás érvényesüljön az oltótenyészetben. Az oltótenyészetet a kísérleti tenyészetekkel megegyező körülmények között kell inkubálni. Mérni kell az élőanyag mennyiségének növekedését az oltótenyészetben, ellenőrizendő, hogy a vizsgált törzsnek az adott tenyésztési

▼M6

körülmények közötti szaporodása a megfelelő tartományon belül marad-e. Az algatenyésztési eljárás egy példája a 4. függelékben található. Elkerülendő a kísérlet alatt az egyidejű sejtosztódást, szükség lehet esetleg az oltótenyészet egy második szaporítási lépésére is.

A kísérleti oldatok elkészítése

27. Minden kísérleti oldatnak azonos koncentrációban kell tartalmaznia a tápoldatot és a vizsgált algák kiindulási élőanyagtömegét. A kiválasztott koncentrációjú kísérleti oldatokat rendszerint a vizsgált vegyi anyag törzsoldatának, a tápoldatnak és az oltótenyészetnek az összekeverésével kell előállítani. A törzsoldatokat általában a vizsgált vegyi anyagnak a kísérleti oldattal való feloldásával kell elkészíteni.

28. Oldószerek (pl. aceton, tercier butilalkohol és dimetil-formamid) használhatók hordozóanyagként a vízben rosszul oldódó vegyi anyagoknak a kísérleti oldatba juttatásához (2)(3). Az oldószer-koncentráció nem haladhatja meg a 100 µl/l-t, és az oldószert a kísérletsorozatban használt minden tenyészethez (beleértve a kontrolltenyészeteket is) azonos koncentrációban hozzá kell adni.

Inkubáció

29. A kísérleti lombikokat légáteresztő dugóval kell lezárni. A lombikokat rázás után a tenyésztőberendezésbe kell helyezni. A kísérlet folyamán az algáknak lebegniük kell, és elő kell segíteni a CO_2-átadást. Ebből a célból folyamatos rázást vagy keverést kell alkalmazni. A tenyészeteket 21 és 24 °C közötti hőmérséklet-tartományban kell tartani ± 2 °C eltérésen belül szabályozva. Az 2. függelékben nem szereplő fajok, pl. a trópusi fajok esetében magasabb hőmérséklet lehet megfelelő, feltéve hogy az érvényességi kritériumok teljesülnek. Ajánlott a lombikok véletlenszerű elrendezése majd naponkénti áthelyezése az inkubátorban.

30. A vizsgálat során a kontrolltenyészet tápoldatának pH-értéke nem növekedhet 1,5-nél nagyobb mértékben. Fémek, és a kísérlet pH-ja körüli értéken részlegesen disszociáló vegyi anyagok esetében szükséges lehet a pH-eltolódás korlátozása a reprodukálható és jól definiált eredmények érdekében. A 0,5 pH-egységnél kisebb eltolódás biztosítása technikailag kivitelezhető és a környezeti levegőből az oldatba történő CO_2-bevitel megfelelő sebességének biztosításával, például a rázás intenzitásának növelésével lehet megvalósítani. Másik lehetőség a CO_2-igény csökkentése a kiindulási élőanyag mennyiségének vagy a kísérlet időtartamának csökkentésével.

31. A felületnek, ahol a tenyészetek inkubálása történik, folytonos egyenletes fluoreszcens megvilágítást (pl. „hideg-fehér” vagy „nappali” fény) kell kapnia. Az alga- és cianobaktériumtörzsek fényigénye eltérő. A fényerőt úgy kell megválasztani, hogy az megfeleljen a vizsgált organizmusnak. A javasolt zöldalga-fajokra a kísérleti oldatok szintjén a fényerőt a 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ tartományból kell kiválasztani, a megfelelő érzékelővel a fotoszintetikusan hatékony, 400–700 nm-es hullámhossz-tartományban mérve. Néhány faj, főként az Anabaena flos-aquae jól növekszik kisebb fényerő mellett, és a nagyobb fényerő károsíthatja. Ezekre a fajokra a 40–60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ tartományba eső átlagos fényerőt kell választani. (A luxban kalibrált fénymérő berendezéseknél a hideg fehér fényre megadott 4 440–8 880 luxos tartomány felel meg az ajánlott 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$-es fényerőnek). Az inkubációs területen az átlagos fényerő±15 %-ának megfelelő fényerőt kell fenntartani.

▼M6

A vizsgálat időtartama

32. A kísérlet hossza szokásos esetben 72 óra. Használható azonban rövidebb vagy hosszabb kísérleti időtartam is, feltéve, hogy a 11. pontban előírt összes érvényességi kritérium teljesül.

Mérések és analitikai vizsgálatok

33. Az alga élőanyag-mennyiségét a kísérlet ideje alatt minden lombikban legalább naponta meg kell határozni. Ha a mérések a kísérleti oldatból pipettával vett kis térfogatú mintákkal történnek, ezeket a mintákat nem kell visszajuttatni a lombikba.

34. Az élőanyag mennyiségének mérése mikroszkópos manuális sejtszámlálással vagy elektronikus részecskeszámlálással (sejtszámlálás és/vagy élőanyag térfogata) történik. Alternatív eljárások, pl. áramlásos citometria, *in vitro* vagy *in vivo* klorofillfluoreszcencia (5)(6), vagy az optikai sűrűség mérése is használható, ha igazolni lehet az élőanyagtömeggel fennálló kielégítő korrelációt az élőanyagtömegnek a kísérletben előforduló tartományában.

35. Az oldatok pH-ját a kísérlet kezdetén és végén meg kell mérni.

36. Amennyiben az alkalmazott koncentrációtartományban a vizsgált vegyi anyag meghatározásához rendelkezésre áll analitikai módszer, akkor a kísérleti oldatokat elemezni kell a kiindulási koncentrációk ellenőrzése, illetve annak ellenőrzése céljából, hogy a kísérletben használandó koncentrációk mindvégig fennállnak-e a kísérlet során.

37. Elegendő lehet a vizsgált vegyi anyag egy alsó és felső koncentráció-határértékének, valamint a várható EC_{50} érték körüli koncentrációjának a mérése a kísérlet kezdetén és végén, ha valószínű, hogy a kísérlet során a koncentráció kevesebb mint 20 %-kal tér el a névleges értéktől. Ha nem valószínű, hogy a koncentrációk a névleges érték 80–120 %-án belül maradnak, ajánlott az összes kísérleti koncentráció mérése a kísérlet kezdetén és végén. Illékony, instabil és erősen adszorbeálódó vegyi anyagoknál további mintavétel ajánlott 24 óránként végzendő elemzéshez a kísérlet folyamán mindvégig, hogy az anyagveszteség még jobban meghatározható legyen. Ilyen vegyi anyagoknál további ismétlésekre lehet szükség. A vizsgált vegyi anyag koncentrációjának meghatározását minden esetben elegendő csak egyetlen ismétlés lombikjából elvégezni az egyes kísérleti koncentrációkra (vagy a lombikok ismétlésenként egyesített tartalmán).

38. A kifejezetten a vizsgálat folyamán előálló kísérleti koncentrációk méréséhez készített oldatokat a kísérlethez használtakkal megegyező módon kell kezelni, azaz ezeket is be kell oltatni algával és a kísérleti körülményekkel azonos körülmények között inkubálni kell. Ha az oldott vegyi anyag koncentrációját kell mérni, szükséges lehet az algák eltávolítása az oldatból. Az elválasztást lehetőleg az algák kiülepedéséhez elegendő, de kis fordulatszámú centrifugálással kell végezni.

39. Ha kimutatható, hogy a vizsgált vegyi anyag koncentrációját a vizsgálat időtartama alatt sikerült a névleges vagy a mért kezdeti koncentráció ± 20 %-os környezetében tartani, akkor az eredmények a névleges vagy mért kezdeti értékek alapján elemezhetők. Ha a névleges vagy a mért kezdeti koncentrációtól való eltérés nem maradt belül a ±20 % tartományon, akkor az eredményeket a kísérlet alatti koncentrációk mértani átlaga, vagy a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának csökkenését leíró modellek alapján kell elemezni (3)(7).

▼M6

40. Az algaszaporodás gátlásának vizsgálata dinamikusabb vizsgálati rendszer, mint a legtöbb hasonló, a vízi toxicitást mérő rövid időtartamú vizsgálat. Ennek következtében a tényleges kísérleti koncentrációkat esetleg nehezen lehet meghatározni, főleg kis koncentrációk esetén, és ha a vizsgált vegyi anyag abszorbeálódik. Ilyen esetekben az, ha a vizsgált vegyi anyag a növekvő élőanyagban való adszorpciója miatti eltűnik az oldatból, nem jelenti azt, hogy eltávozott a vizsgált rendszerből. A kísérlet eredményeinek elemzése során ellenőrizni kell, hogy a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának a vizsgálat során történő csökkenése együtt jár-e a szaporodásgátlás csökkenésével. Ha ez a helyzet áll fenn, mérlegelni lehet egy olyan megfelelő modell alkalmazását, amely leírja a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának csökkenését (7). Ha ez nem áll fenn, akkor az eredmények elemzését megfelelő lehet a kiindulási (névleges vagy mért) koncentrációkra alapozni.

Egyéb észrevételek

41. Az oltótenyészet normális és egészséges fenotípusának ellenőrzésére, illetve a kísérlet végén az algák esetleges abnormális fenotípusának (ami lehet a vizsgált vegyi anyag hatása) megállapítására mikroszkópos vizsgálatokat célszerű végezni.

Határérték-vizsgálat

42. Bizonyos körülmények között, például amikor egy előzetes vizsgálat azt jelzi, hogy a vizsgált vegyi anyagnak nincs toxikus hatása 100 mg/l koncentrációig, vagy a kísérleti oldatban való oldhatósága határáig (amelyik a kettő közül kisebb), határérték-vizsgálat végezhető, amely egy kontrollcsoport és egy kezelt csoport (100 mg/l-es vagy az oldhatósági határral megegyező koncentrációval) szaporodási viselkedésének összehasonlítását jelenti. A vizsgálat során fokozottan ajánlatos elemezni az expozíció koncentrációját. A határérték-vizsgálatra érvényes az összes korábban leírt kísérleti körülmény és érvényességi kritérium, kivéve, hogy a kezelt ismétlések számának legalább hatnak kell lennie. A kontroll- és a kezelt csoport hatásváltozóit az átlagok összevetésére használható statisztikai analízissel (pl. Student-féle t-próba) lehet elemezni. Ha a két csoport szórásnégyzetei nem egyenlőek, akkor egyenlőtlen szórásnégyzetekre korrigált t-próbát kell végezni.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

A szaporodási görbék szerkesztése

43. A kísérleti lombikokban lévő élőanyag mennyiségét ki lehet fejezni a mérésre használt helyettesítő paraméter (pl. sejtszám, fluoreszcencia) mértékegységében is.

44. Táblázatba kell foglalni a vizsgált tenyészetekben és a kontrolltenyészetekben a becsült élőanyag-koncentrációkat, a vizsgált anyag koncentrációival és a legalább egész órákra kerekített mérési időpontokkal együtt, és ezek alapján kell megszerkeszteni a szaporodási görbéket. Ebben az első szakaszban használható akár logaritmikus, akár lineáris skála, a logaritmikus skála azonban kötelező, és általában jobban megjeleníti a kísérleti időszak alatt a szaporodási viselkedésben bekövetkező eltéréseket. Megjegyzendő, hogy logaritmikus ábrázolás esetén az exponenciális szaporodás egyenes vonalat ad, és a vonal meredeksége adja meg a fajlagos szaporodási sebességet.

45. A görbék segítségével meg kell vizsgálni, hogy a kontrolltenyészetek a vizsgálat során mindvégig exponenciálisan szaporodtak-e, a várt sebességgel. Kritikusan meg kell vizsgálni minden adatpontot és a görbék lefutását, valamint ellenőrizni kell az adatsorokat és eljárásokat a lehetséges hibák tekintetében. Főleg azokat az adatok igényelnek ellenőrzést, melyeknél az eltérés valószínűleg szisztematikus hibából ered. Ha nyilvánvaló, hogy eljárási hiba történt, illetve ennek nagy a valószínűsége, akkor az adott adatpontot érvénytelenként meg kell jelölni, és ki kell zárni a további statisztikai

▼M6

elemzésből. (Ha a két vagy három ismétlésből az egyik lombik algakoncentrációja nulla, az azt jelezheti, hogy a lombik nem megfelelően lett beoltva, vagy megtisztítva). Az érvénytelenként elvetett adatpontoknál az elvetést egyértelműen indokolni kell a mérési jegyzőkönyvben. Csak eljárási hiba (ritka) lehet elfogadható indok, egyszerű pontatlanság nem. Az érvénytelen adatpontok azonosítására szolgáló statisztikai módszerek csak korlátozottan használhatóak az ilyen típusú problémákra, és nem helyettesítik a szakértői megítélést. Az érvénytelen adatpontokat (ilyenként megjelölve) célszerű megtartani az adatpontok között, feltüntetve azokat a későbbi grafikus vagy táblázatos megjelenítések során.

Hatásváltozók

46. A vizsgálat célja a vizsgált vegyi anyag által az alga szaporodására gyakorolt hatás meghatározása. Ez a vizsgálati módszer két hatásváltozót tartalmaz, mert a különböző jogrendszerek preferenciái és szabályozási igényei eltérőek. Hogy a vizsgálati eredmények valamennyi jogrendszerben elfogadhatók legyenek, a hatást mindkét alábbi hatásváltozó alapján meg kell határozni.

a) Átlagos fajlagos szaporodási sebesség: ez a hatásváltozó az élőanyag tömegének a kísérlet alatt bekövetkező logaritmikus növekedése alapján számítható, egy napra vetítve.

b) Szaporulat: ez a hatásváltozó a kísérlet végén mérhető élőanyagtömeg mínusz a kiindulási élőanyagtömeg.

47. Megjegyzendő, hogy a két hatásváltozó alapján számított toxicitásértékek nem hasonlíthatók egymáshoz, és a vizsgálatok eredményeinek felhasználása során erre a különbségre tekintettel kell lenni. A jelen vizsgálati módszerben előírt vizsgálati körülmények betartása mellett a két számítási eljárás matematikai háttere következtében az átlagos fajlagos növekedési sebességen alapuló EC_x értékek (E_rC_x) általában nagyobbra adódnak, mint a szaporulaton alapuló EC_x értékek (E_yC_x). Ezt az eltérést nem szabad úgy értelmezni, hogy egyik hatásváltozó érzékenyebb lenne a másiknál; egyszerűen arról van szó, hogy a két érték matematikailag mást jelent. Az átlagos fajlagos szaporodási sebesség koncepciója az algák korlátozás nélküli tenyészetekben történő általános exponenciális szaporodási sémáján alapszik, ahol a toxicitás mértéke a szaporodási sebességre gyakorolt hatások alapján becsülhető, függetlenül a kontrolltenyészet fajlagos szaporodási sebességének abszolút értékétől, a koncentráció-válasz görbe meredekségétől, vagy a kísérlet időtartamától. A szaporulatból származtatott eredmények ezzel szemben mindezektől a változóktól is függnek. Az E_yC_x függ az egyes vizsgálatokban használt algafajok fajlagos szaporodási sebességétől és a legnagyobb fajlagos szaporodási sebességétől, ami a fajok, sőt még különböző algatörzsek között is eltérő lehet. Ez a hatásváltozó nem használható az algafajok, de még a különböző törzsek mérgező anyagokkal szembeni érzékenységének összehasonlítására sem. Bár tudományos szempontból a toxikus hatást indokoltabb az átlagos fajlagos növekedési sebességből meghatározni, ez a vizsgálati módszer a szaporulaton alapuló toxicitásszámítást is tartalmazza, mert egyes országok hatályos jogszabályi követelményei ezt is szükségessé teszik.

Átlagos szaporodási sebesség

48. Az adott időszakra vonatkozó átlagos fajlagos szaporodási sebesség az egyes kontrolltenyészetekre és kezelt tenyészetekre az élőanyag mennyiségének logaritmikus növekedéseként számítható ki a következő egyenletből [1]:

▼M6

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{nap}^{-1}) \qquad [1],$$

ahol:

μ_{i-j} az átlagos fajlagos szaporodási sebesség i-től j időpontig;

X_i az élőanyag mennyisége i időpontban;

X_j az élőanyag mennyisége j időpontban.

Minden kezelt és kontrollcsoportra ki kell számítani egy átlagot a szaporodási sebességre, valamint meg kell becsülni a szórásnégyzetet.

49. Az átlagos fajlagos szaporodási sebességet ki kell számolni a teljes kísérleti időszakra (általában 0–3. nap), kezdeti értékként a névlegesen beoltott élőanyagot, nem pedig a mért kezdeti értéket használva, mert ilyen módon általában nagyobb pontosság érhető el. Ha az élőanyag mérésére használt mérőeszköz lehetővé teszi az oltó élőanyag kis mennyiségének megfelelően pontos meghatározását (pl. áramlásos citométer), akkor használható a mért kezdeti élőanyag-koncentráció. A szakaszonkénti szaporodási sebességet is meg kell állapítani a vizsgálat minden egyes napjára vonatkozóan (0–1., 1–2. és 2–3. nap), ugyanúgy számítva, mint a fajlagos szaporodási sebességet, és meg kell vizsgálni, hogy a kontrolltenyészet szaporodási sebessége állandó marad-e (lásd az érvényességi kritériumokat a 11. pontban). Az első napon kapott, a teljes átlagos fajlagos szaporodási sebességnél szignifikánsan kisebb fajlagos szaporodási sebesség késési (lag) fázist jelez. Míg a késési (lag) fázis az előtenyészet megfelelő adagolásával minimalizálható és gyakorlatilag kiküszöbölhető a kontrolltenyészetekben, addig a vizsgált anyagnak kitett tenyészetekben a késési (lag) fázis a kezdeti toxicitás-stressz utáni helyreállást, vagy pedig a vizsgált vegyi anyagnak az expozíció elején történő elveszése (beleértve az élőanyagba történő szorpciót) miatti kisebb gátló hatást jelezhet. Ebből következően a szakaszonkénti szaporodási sebesség használható a vizsgált vegyi anyagnak a kísérlet során mutatott hatásainak az értékeléséhez. Ha a szakaszonkénti növekedési sebesség és az átlagos növekedési sebesség között nagy különbséget tapasztalunk, az azt jelenti, hogy a növekedés mintája erősen eltér az állandó kitevőjű exponenciális növekedéstől és különösen ajánlott a növekedési görbék részletes vizsgálata.

50. A szaporodási sebesség százalékos gátlása az egyes kezelt ismétlésekre vonatkozóan az alábbi egyenletből számítható ki [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

ahol:

$\%I_r$ = az átlagos szaporodási sebesség százalékos gátlása;

μ_C = az átlagos szaporodási sebesség átlaga (μ) a kontrollcsoportban;

μ_T = az átlagos szaporodási sebesség a kezelt ismétlésben.

51. Ha a kísérleti oldatok oldószer felhasználásával készülnek, oldószer nélküli kontrolltenyészetek helyett oldószeres kontrolltenyészeteket kell használni a százalékos gátlás számításakor.

Szaporulat

52. A szaporulatot az egyes kontrolltenyészetekre és kezelt tenyészetekre úgy kell kiszámítani, hogy a kísérlet végén mért élőanyagtömegből kivonjuk a kiindulási élőanyagtömeget. Minden egyes vizsgálati koncentráció és kontrollcsoport esetén kiszámítjuk a szaporulat középértékét és tapasztalati szórásnégyzetét. Az egyes kezelt ismétlések vonatkozásában a szaporulatra vonatkozó százalékos gátlás (% I_y) az alábbiak szerint számítható ki:

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \qquad [3]$$

ahol:

$\%\ I_y$ = a százalékos szaporulatgátlás;

Y_C = a szaporulat átlaga a kontrollcsoportban;

Y_T = a szaporulat értéke a kezelt ismétlésekben.

A koncentráció-válasz görbe szerkesztése

53. A százalékos szaporodásgátlást ábrázolni kell a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának (logaritmus) függvényében, és alaposan meg kell vizsgálni a görbét, figyelmen kívül hagyva azokat az adatpontokat, amelyek az első szakaszban érvénytelenként lettek megjelölve. Egy egyenest kell illeszteni az adatpontokra kézzel vagy számítógépes interpolációval, ami első benyomást ad a koncentráció és a válasz összefüggéseiről, majd ezután kifinomultabb módszert, lehetőleg számítógépes statisztikai módszert kell használni. Az adatok tervezett felhasználásának, minőségének (pontosságának) és mennyiségének, valamint a rendelkezésre álló adatelemző eszközök függvényében lehet úgy dönteni (és néha jól meg lehet indokolni), hogy ezen a szinten befejeződik az adatelemzés és a meghatározó értékek, azaz az EC_{50} és az EC_{10} (és/vagy EC_{20}) egyszerűen leolvashatók a kézzel illesztett görbéről (lásd még alább a stimulációs hatásokról szóló pontot). A következők indokolhatják a statisztikai módszer mellőzését:

— Az adatok nem megfelelőek ahhoz, hogy számítógépes módszerrel további, még megbízhatóbb eredmény szülessen, mint a szakértői megítéléssel – ilyen esetekben néhány számítógépes program nem is képes megbízható megoldást adni (az iteráció nem konvergál stb.).

— A stimulációs szaporodási viselkedés nem kezelhető pontosan a rendelkezésre álló számítógépes programokkal (lásd alább).

Statisztikai eljárások

54. A statisztikai számítások célja, hogy regressziószámítással kvantitatív koncentráció-válasz összefüggést állítsunk elő. Lehetőség van arra, hogy a hatásadatok – például probit-, logit- vagy Weibull-modell (8) szerinti – linearizációs transzformálását követően súlyozott lineáris regressziót végezzünk, de előnyösebb inkább nemlineáris regressziót alkalmazni, mert ez jobban kezeli az adatok elkerülhetetlen irregularitását és a sima eloszlástól való eltérést. A nulla és a teljes gátlás környezetében az irregularitást a transzformáció felnagyíthatja, ami a számítás szempontjából előnytelen (8). Meg kell jegyezni, hogy a transzformációval kapott probit, logit vagy Weibull egységeket használó szabványos elemzési módszerek kvantált adatok (pl. halálozás vagy túlélés) használatára vannak tervezve, és a szaporodási adatokkal vagy az élőanyagra vonatkozó adatokkal való alkalmazásukhoz módosítani kell őket. Az EC_x-értékek folytonos adatokból való számítására alkalmas módszereket a (9), (10) és (11) irodalom ismertet. A nem lineáris regresszió használatáról a 5. függelékben található részletesebb információ.

55. Az EC_x értékek pontbecsléseinek kiszámításához a koncentráció-válasz összefüggést kell használni minden elemzendő hatásváltozóra. Ha lehetséges, meg kell határozni az egyes becslések 95 %-os konfidenciahatárát. A hatásadatok regressziós modellhez illeszkedésének jóságát grafikus vagy statisztikai módszerrel kell megállapítani. A regressziószámítást az egyes vizsgálati edényeken nyert értékekkel, nem pedig a vizsgálati csoportok

▼M6

középértékével kell elvégezni. Ha azonban a nem lineáris görbeillesztés bonyolult vagy nem sikerül az adatok túl nagy szórása miatt, a problémát meg lehet kerülni a csoportátlagok regresszióanalízésével, ami egy gyakorlati mód a feltehető érvénytelen adatpontok hatásának csökkentésére. Ennek a lehetőségnek a használatát a szokásos eljárástól való eltérésként fel kell tüntetni a mérési jegyzőkönyvben, hivatkozva arra, hogy a görbeillesztések az egyedi ismétléseknél kapott adatokkal nem adtak jó eredményt.

56. Ha a rendelkezésre álló regressziós modellek/módszerek nem alkalmasak a konkrét adatok elemzésére, az EC_{50}-re vonatkozó becsléseket és a konfidenciahatárokat „bootstrap” technikával együtt alkalmazott lineáris interpolációval (13) is előállíthatjuk.

57. Az LOEC és ennélfogva az NOEC becsléséhez is, illetve a vizsgált vegyi anyag által a szaporodási sebességre gyakorolt hatásnak a becsléséhez szórásnégyzet-elemzési (ANOVA) eljárások segítségével össze kell hasonlítani a kezelt csoport átlagait. Az egyes koncentrációkhoz tartozó középértékeket ezután alkalmasan megválasztott többszörös összehasonlító módszerrel vagy trendpróbával a kontrollcsoporton nyert középértékhez hasonlítjuk. A Dunnett- vagy a Williams-féle módszer használható lehet erre a célra (12)(14)(15)(16)(17). Lényeges ellenőrizni, hogy fennáll-e az ANOVA-nak a szórásnégyzetek homogenitására vonatkozó feltevése. Ezt az ellenőrzést grafikusan vagy formális próbával (17) végezhetjük. A Levene- és Bartlett-féle próbák megfelelőek ehhez. Ha a szórásnégyzet homogenitásának követelménye nem teljesül, az néha az adatok logaritmikus transzformációjával korrigálható. Ha a szórásnégyzetek heterogenitása túlságosan szélsőségesnek bizonyul, és transzformációval nem javítható, akkor célszerű megfontolni például a lépésenkénti Jonkheere-trendpróba alkalmazását. Az NOEC meghatározásához további útmutatást ad a (11) irodalom.

58. Az újabb keletű tudományos eredmények az NOEC-koncepció elhagyásának ajánlásához és az EC_x regresszión alapuló pontbecsléssel történő meghatározásával való helyettesítéséhez vezettek. Ehhez az algavizsgálathoz még nem állapítottak meg megfelelő x értéket. A 10–20 %-os tartomány azonban megfelelőnek tűnik (a választott hatásváltozótól függően), és célszerű mind az EC_{10}-et, mind az EC_{20}-at megadni a mérési jegyzőkönyvben.

Szaporodásstimuláció

59. Kis koncentrációk mellett néha szaporodásstimuláció (negatív gátlás) figyelhető meg. Ezt vagy a hormesis (kétfázisú reagálás) jelensége („toxikus anyag által kiváltott stimuláció”), vagy a vizsgált anyaggal együtt az alkalmazott ásványi sókat tartalmazó tápoldatba került szaporodásserkentő tényezők okozhatják. Megjegyzendő, hogy a szervetlen tápanyagok hozzáadásának nem lehet semmilyen közvetlen hatása, mert a kísérleti oldatnak a kísérlet folyamán végig feleslegben kell tartalmaznia a tápanyagot. Kis dózisú stimuláció gyakran figyelmen kívül hagyható az EC_{50} kiszámítása során, hacsak mértéke nem rendkívül nagy. Ha azonban rendkívül nagy mértékű, vagy pedig kis x értékre kell EC_x-et számítani, akkor speciális eljárásokra lehet szükség. Lehetőség szerint kerülni kell a stimulációs hatások törlését az adatelemzésből, és ha a rendelkezésre álló görbeillesztő szoftver nem képes kezelni a kisebb mértékű stimulációkat, akkor visszatevéses mintavétellel („bootstrap” módszer) együtt alkalmazott lineáris interpoláció használható. Ha a stimuláció rendkívül nagy, akkor mérlegelni lehet hormesismodell alkalmazását (18).

Nem toxikus növekedésgátlás

60. A fényt abszorbeáló anyagok a szaporodási sebesség csökkenését okozhatják, hiszen az árnyékolás csökkenti a kapott fény mennyiségét. Az ilyen jellegű fizikai hatásokat a kísérleti körülmények módosításával el kell választani a toxikus hatásoktól, és az előbbit külön kell dokumentálni. Útmutatás a (2) és (3) szakirodalmi hivatkozásban található.

VIZSGÁLATI JEGYZŐKÖNYV

61. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

▼**M6**

Vizsgált vegyi anyag:

— fizikai jelleg és a vonatkozó fizikai és kémiai tulajdonságok, beleértve a vízoldhatósági határértéket is,

— kémiai azonosító adatok (pl. CAS-szám), tisztaság (szennyeződések).

A vizsgálathoz felhasznált faj:

— a törzs, a szállító vagy az eredet, és az alkalmazott tenyésztési körülmények.

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgálat megkezdésének időpontja és időtartama;

— a kísérlet kivitelezésének leírása: kísérleti eszközök, a tenyészetek mennyisége, az élőanyag sűrűsége a vizsgálat kezdetén;

— a tápoldat összetétele;

— kísérleti koncentrációk és ismétlések (pl. ismétlések száma, kísérleti koncentrációk száma és az alkalmazott mértani sor);

— a kísérleti oldatok készítésének leírása, beleértve az oldószerek használatát stb.

— tenyésztőkészülék;

— fényerő és -minőség (fényforrás, homogenitás);

— hőmérséklet;

— kísérleti koncentrációk: a névleges kísérleti koncentrációk és a lombikokban lévő vizsgált vegyi anyag koncentrációjának meghatározására szolgáló analízisek eredménye. A vizsgálati mátrixra vonatkozóan a mérési jegyzőkönyvben fel kell tüntetni a módszer visszanyerési hatékonyságát és a mennyiségi meghatározás határértékét;

— minden eltérés ettől a vizsgálati módszertől;

— az élőanyag tömegének meghatározási módszere, valamint a mért paraméter és a száraz tömeg közötti korreláció bizonyítéka;

Eredmények:

— pH-értékek minden kezelés kezdetén és végén;

— az élőanyag tömege minden lombikban és minden mérési pontban, valamint az élőanyag mérésének módszere;

— szaporodási görbék (az élőanyag mennyiségének ábrázolása az idő függvényében);

— hatásváltozók számított értéke minden kezelt ismétlésre, továbbá az ismétlések középértéke és szórásnégyzete;

— a koncentráció-válasz összefüggés grafikus ábrázolása;

▼M6

— toxicitásbecslés a hatásváltozókra, pl. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} és a kapcsolódó konfidenciaintervallumok. Az LOEC és az NOEC, ha ezek kiszámítása megtörtént, és a meghatározásukhoz használt statisztikai módszerek;

— ANOVA alkalmazása esetén a hatás kimutatásának mérethatára (például a legkisebb szignifikáns különbség);

— a vizsgálatok során észlelt esetleges növekedésserkentés;

— bármilyen más észlelt hatás, például az algák morfológiai változása;

— az eredmények szöveges elemzése, beleértve az e vizsgálati módszertől való eltérések vizsgálat kimenetelére gyakorolt hatását.

IRODALOM

(1) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (1993). ISO 8692 Water quality – Algal growth inhibition test.

(2) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(4) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

▼**M6**

(12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121

(13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 519-531.

(17) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

(18) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

1. függelék

Fogalommeghatározások

E vizsgálati módszerben az alábbi definíciók és rövidítések használatosak:

Élőanyag: egy populációban jelen lévő élő anyag száraz tömege egy adott mennyiségben kifejezve; pl. mg alga/liter vizsgálati oldat. Általában az „élőanyag” tömegként van definiálva, de ebben a vizsgálatban a szó „tömeg/térfogat”-ot jelent. Szintén ebben a vizsgálatban az élőanyag tömege helyett jellemzően sejtszám, fluoreszcencia stb. mérése történik, és az „élőanyag” kifejezés használata így ezekre a helyettesítő mérőszámokra is utal.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Variációs együttható (CV): egy paraméter változékonyságának dimenzió nélküli mérőszáma; definíció szerint a szórás és az átlag aránya. Ezt százalékos formában is ki lehet fejezni. A kontroll ismétlésekben az átlagos fajlagos szaporodási sebesség átlagos variációs együtthatóját az alábbiak szerint lehet kiszámítani:

1. Ki kell számítani az átlagos fajlagos szaporodási sebesség %-os variációs együtthatóját a naponkénti/szakaszonkénti szaporodási sebességekből a megfelelő ismétlésekre;

2. Ki kell számítani az 1. pontban kiszámított összes érték átlagát, ami megadja a kontroll ismétlésekben a naponkénti/szakaszonkénti átlagos fajlagos szaporodási sebesség átlagos variációs együtthatóját.

EC_x: a vizsgálati oldatban oldott vizsgált vegyi anyag olyan koncentrációja, ami meghatározott expozíciós idő alatt (ha eltér a teljes vagy szokásos kísérleti időtartamtól, akkor pontosan meg kell adni) a vizsgált organizmus x %-os (pl. 50 %) szaporodásgátlását eredményezi. Hogy egyértelmű legyen, hogy az EC értékét a növekedési sebességből vagy a szaporulatból nyertük-e, növekedési sebesség esetén „E_rC”-t, szaporulat esetén pedig „E_yC”-t írunk.

Tápoldat: az a teljes mesterséges tenyésztő közeg, amelyben a vizsgált algák a vizsgált vegyi anyag jelenlétében szaporodnak. A vizsgált vegyi anyag általában oldott formában van jelen a vizsgálati oldatban.

Növekedési sebesség (átlagos fajlagos növekedési sebesség): az élőanyagtömeg logaritmikus növekedése az expozíciós idő alatt.

Észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció (LOEC): az a legkisebb vizsgált koncentráció, amely mellett adott expozíciós idő alatt a vegyi anyag statisztikailag szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) csökkenti a növekedést a kontrolltenyészethez képest. Az LOEC felett ugyanakkor minden koncentrációnak legalább akkora káros hatást kell eredményeznie, mint amelyet az LOEC okoz. Ha ez a két feltétel nem elégíthető ki, az LOEC (és így az NOEC) megválasztását részletesen indokolni kell.

Észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC): az a vizsgált koncentráció, amely közvetlenül az LOEC alatt helyezkedik el.

Hatásváltozó: a toxikus hatás becslésére használt változó, amely különböző számítási módokkal az élőanyag leírására szolgáló bármelyik mért paraméterből levezethető. Ebben a vizsgálati módszerben a hatásváltozók a szaporodási sebesség, illetve a szaporulat, amelyek közvetlenül az élőanyag mérésével, vagy pedig az említett helyettesítő mérőszámok valamelyikének mérésével kaphatók meg.

▼**M6**

Fajlagos szaporodási sebesség: egy mérési paraméter (ebben a vizsgálati módszerben az élőanyag mennyiségének változása) természetes alapú logaritmusainak különbségéből és a változáshoz tartozó időtartamból képzett hányadosként definiált hatásváltozó.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

Szaporulat: az élőanyag vizsgálat alatti mennyiségi növekedésének a kifejezésére használt mérési változó értéke; az expozíciós idő végén mért változóérték mínusz az expozíciós idő kezdetén mért változóérték.

▼M6

2. függelék

A vizsgálathoz bizonyítottan alkalmas törzsek

Zöldalgák

Pseudokirchneriella subcapitata, (régebbi elnevezéssel *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (régebbi elnevezéssel *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Kovamoszatok

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Cianobaktériumok

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

A törzsek eredete

Az ajánlott törzsek egyfajú algatenyészetként beszerezhetőek az alábbi törzsgyűjteményekből (ábécésorrendben):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
Egyesült Államok

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
Egyesült Királyság

SAG: Sammlung von Algenkulturen
Albrecht-von-Haller-Institut
Universität Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
NÉMETORSZÁG

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
Egyesült Államok

▼M6

A javasolt fajok fenotípusa és jellemzői

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Jellemzők	Hajlott, csavart egyedi sejtek	Ovális, főként egyedi sejtek	Pálcák	Ovális sejtekből álló fonalak	Pálcák
Méret (hossz x szélesség) μm	8 – 14 × 2 – 3	7 – 15 × 3 – 12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Sejttérfogat (μm^3/sejt)	40 – 60 (1)	60 – 80 (1)	40 – 50 (1)	30 – 40 (1)	2,5 (2)
Sejt száraz tömege (mg/sejt)	$2 – 3 \times 10^{-8}$	$3 – 4 \times 10^{-8}$	$3 – 4 \times 10^{-8}$	$1 – 2 \times 10^{-8}$	$2 – 3 \times 10^{-9}$
Szaporodási sebesség (3) (nap^{-1})	1,5 – 1,7	1,2 – 1,5	1,4	1,1 – 1,4	= 2,0 – 2,4

(1) Elektronikus részecskeszámlálóval mérve
(2) A méretből számítva
(3) Leggyakrabban tapasztalt szaporodási sebesség OECD-tápoldatban kb. 70 μE m^{-2} s^{-1} fényerőnél és 21 °C-on

Egyedi ajánlások a vizsgálathoz ajánlott fajok tenyésztésére és kezelésére

Pseudokirchneriella subcapitata és Desmodesmus subspicatus

Ezeket a zöldalgákat általában könnyű fenntartani különféle tápoldatokban. A megfelelő tápoldatról a tenyészetgyűjteményektől szerezhető be információ. A sejtek általában különállóak, és a sejtsűrűség könnyen mérhető elektronikus részecskeszámlálóval vagy mikroszkóppal.

Anabaena flos-aquae

Törzstenyészet fenntartására számos tápoldat használható. Különösen fontos, hogy megújításkor elkerüljük az egyszeres (batch) tenyészet túlfutását az exponenciális fázison, mert azután már nehéz helyreállítani a tenyészetet.

Az *Anabaena flos-aquae* fonaltelepekben fejlődik. Ezek mérete a tenyésztési körülményekkel változik. Mikroszkópos vagy elektronikus részecskeszámlálóval végzett élőanyag-meghatározáshoz fontos lehet ezeknek a telepeknek a szétoszlatása.

Részminták ultrahangos kezelése használható a láncok szétoszlatására, hogy csökkenjen a sejtszámlálás változékonysága. A fonalak rövidebb szakaszokra töréséhez szükségesnél hosszabb ultrahangos kezelés roncsolhatja a sejteket. Az ultrahangos kezelés intenzitásának és hosszának minden kezelésnél azonosnak kell lennie.

A változékonyság kompenzálásának elősegítése céljából elegendően nagy számú mezőben kell a számlálást végezni a hemocitométerben (legalább 400 sejt). Ez növeli a mikroszkópos sűrűségmeghatározás megbízhatóságát.

Elektronikus részecskeszámláló használható az *Anabaena* teljes sejttérfogatának meghatározásához, a sejtfonalak óvatos ultrahangos széttörése után. Az ultrahang energiáját úgy kell beállítani, hogy elkerüljük a sejtek roncsolását.

Örvénykeverő (vortex) segítségével vagy hasonló alkalmas módszerrel biztosítani kell, hogy a lombikok beoltására alkalmazott algaszuszpenzió megfelelően el legyen keverve és homogén legyen.

▼M6

A lombikokat kb. 150/perc fordulatszámú körpályás, vagy lengőmozgású rázóasztalra kell helyezni. Más megoldásként szakaszosan keverés is használható az *Anabaena* összetapadási hajlamának csökkentésére. Ha összetapadás történik, ügyelni kell arra, hogy az élőanyag-mérésekhez szükséges minták reprezentatívak legyenek. Az összetapadt algák szétválasztásához erőteljes keverés lehet szükséges a mintavétel előtt.

Synechococcus leopoliensis

Törzstenyészet fenntartására számos tápoldat használható. A megfelelő tápoldatról a tenyészetgyűjteményektől szerezhető be információ.

A *Synechococcus leopoliensis* különálló pálca alakú sejtek formájában szaporodik. A sejtek nagyon kicsik, ami megnehezíti az élőanyag-meghatározáshoz szükséges mikroszkópos sejtszámlálást. Jól használhatók a kb. 1 μm méretű részecskék számlására alkalmas elektronikus részecskeszámlálók. *In vitro* fluorometriai mérések szintén alkalmazhatóak.

Navicula pelliculosa

Törzstenyészet fenntartására számos tápoldat használható. A megfelelő tápoldatról a tenyészetgyűjteményektől szerezhető be információ. Figyelni kell arra, hogy a tápoldatban lennie kell szilikátnak.

A *Navicula pelliculosa* bizonyos körülmények között telepeket hozhat létre. A lipidtermelés következtében az algasejtek néha hajlamosak rétegekben összegyűlni a felszínen. Ilyen körülmények között az élőanyag mennyiségének meghatározásához leveendő minták esetében speciális intézkedések szükségesek ahhoz, hogy a minták reprezentatívak legyenek. Erőteljes rázás, pl. örvénykeverő használata lehet szükséges.

▼**M6**

3. függelék

Tápoldatok

A következő két tápoldat egyike használható:

— OECD-tápoldat: Az OECD 201. vizsgálati iránymutatásában használt eredeti tápoldat, megfelel az ISO 8692-nek is.

— Az USA Környezetvédelmi Hatóságának (EPA) AAP-tápoldata, megfelel az ASTM-nek is.

Ezeknek a tápoldatoknak az elkészítése során laboratóriumi reagenseket vagy analitikai tisztaságú vegyszereket, és ionmentesített vizet kell használni.

Az AAP-tápoldat (USA EPA) és az OECD 201. vizsgálati iránymutatásában használt tápoldat összetétele.

Összetevő	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	

Az EDTA-vas mólarány kissé nagyobb 1-nél. Ez megakadályozza a vas kicsapódását, és ugyanakkor a kelátképződés a nehézfém-ionokkal a lehető legkisebb lesz.

A Navicula pelliculosa kovamoszattal végzett vizsgálat során mindkét tápoldathoz $Na_3SiO_3 \cdot 9H_20$-t kell adni úgy, hogy a koncentráció 1,4 mg Si/l legyen.

▼**M6**

A tápoldat pH-ját akkor kell mérni, amikor egyensúly van az oldat karbonáttartalma és a környezeti levegőben lévő CO_2 parciális nyomása között. Közelítő összefüggés a 25 °C-on mért pH és a moláris bikarbonátkoncentráció között:

$pH_{eq} = 11{,}30 + \log[HCO_3]$

15 mg $NaHCO_3$/l-rel pH_{eq} = 7,5 (EPA-tápoldat), és 50 mg $NaHCO_3$/l-rel pH_{eq} = 8,1 (OECD-tápoldat).

A kísérleti oldatok elemi összetétele

Elemek	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

Az OECD-tápoldat elkészítése

Tápanyag	Koncentráció a törzsoldatban
1. törzsoldat: makrotápanyagok	
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
2. törzsoldat: vas	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
3. törzsoldat: nyomelemek	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Tápanyag	Koncentráció a törzsoldatban
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
4. törzsoldat: bikarbonát	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

A törzsoldatokat membránszűréssel (átlagos pórusátmérő 0,2 μm) vagy autoklávban (120 °C, 15 perc) sterilizálni kell. Az oldatokat 4 °C-on, sötét helyen kell tárolni.

A 2. és 4. törzsoldatokat nem szabad autoklávban kezelni, hanem membránszűréssel kell őket sterilizálni.

Készítsük el a tápoldatot az 1–4. törzsoldatokból vett megfelelő térfogatok és víz összekeverésével:

Adjunk kb. 500 ml sterilizált vízhez:

10 ml-t az 1. törzsoldatból

1 ml-t az 2. törzsoldatból

1 ml-t az 3. törzsoldatból

1 ml-t az 4. törzsoldatból

Töltsük fel az oldatot 1 000 ml-re sterilizált vízzel.

Várjuk meg, hogy a tápoldat egyensúlyba kerüljön a környezetben lévő CO_2-vel, szükség esetén buborékoltassunk át az oldaton steril, szűrt levegőt néhány órán keresztül.

Az EPA-tápoldat elkészítése

1. Adjunk a 2.1–2.7. pontban felsorolt törzsoldatok mindegyikéből 1-1 ml-t kb. 900 ml ionmentesített vagy desztillált vízhez, majd hígítsuk fel 1 literre.

2. A makrotápanyagok törzsoldatainak készítéséhez oldjuk fel az alábbiakat 500 ml ionmentesített vagy desztillált vízben. A 2.1., a 2.2., a 2.3. és a 2.4. pontban szereplő reagensek egyesíthetők egy törzsoldatba.

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	Mikrotápanyagok törzsoldata (lásd a 3. pontot).	
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	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	Lásd az 1. megjegyzést.

▼**M6**

1. megjegyzés: Csak kovamoszatfajokhoz alkalmazandó. Beadható közvetlenül (202,4 mg) vagy törzsoldat formájában úgy, hogy 20 mg/l Si legyen a tápoldatban a végkoncentráció.

3. A mikrotápanyagok törzsoldatának elkészítéséhez oldjuk fel az alábbiakat 500 ml ionmentesített vagy desztillált vízben:

3.1	H_3BO_3	92,760 mg.	
3.2	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	207,690 mg.	
3.3	$ZnCl_2$	1,635 mg.	
3.4	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	79,880 mg.	
3.5	CoCl2·6H2O	0,714 mg.	
3.6	$Na2MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,630 mg.	
3.7	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006 mg.	
3.8	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000 mg.	[Dinátrium-(etiléndinitrilo) tetraacetát].
3.9	$Na_2SiO_4 \cdot 9H_2O$	0,005 mg	Lásd a 2. megjegyzést.

2. megjegyzés: Csak kovamoszatfajok törzstenyészetének tápoldatában alkalmazandó.

4. Állítsa be a pH-t 7,5 ± 0,1 értékre 0,1 N vagy 1,0 N NaOH-dal vagy HCl-dal.

5. Szűrje a tápközeget steril edénybe, vagy 0,22 µm-os membránszűrőn, ha részecskeszámlálót használ, vagy 0,45 µm-os szűrőn, ha nem részecskeszámlálót használ.

6. Felhasználásig tárolja a tápoldatot sötét helyen, kb. 4 °C-on.

▼M6

4. függelék

Példa algatenyésztési eljárására

Általános megjegyzések

Az alábbiakban ismertetett eljárások alapján végzett tenyésztés célja a toxicitásvizsgálatokhoz használható algatenyészetek létrehozása.

Az algatenyészetek bakteriális fertőződésének elkerülése érdekében megfelelő módszereket kell használni. Tiszta (axenikus) tenyészetek kívánatosak lehetnek, de egyfajú algatenyészeteket kell létrehozni és felhasználni.

Minden beavatkozást steril körülmények között kell végezni, elkerülendő a baktériumokkal, vagy más algákkal történő szennyeződést.

Eszközök és anyagok

Lásd a vizsgálati módszer alatt: Eszközök.

Eljárások algatenyészetek előállításához

Tápoldatok készítése:

A tápoldat minden tápsóját tömény törzsoldatként készítik, és sötét hideg helyen tárolják. Ezeket az oldatokat szűréssel vagy autoklávban sterilizálni kell.

A tápoldat a megfelelő mennyiségű törzsoldat desztillált vízhez való hozzáadásával készül, ügyelve arra, hogy ne történjen befertőződés. Szilárd táptalajhoz 0,8 % agart kell adni.

Törzstenyészet:

A törzstenyészetek kis algatenyészetek, amelyeket rendszeresen friss táptalajba kell oltani azért, hogy kezdeti vizsgált anyagként szolgáljanak. Ha nem használnak rendszeresen tenyészeteket, akkor azokat ferde agarra kell széleszteni. E tenyészeteket minden két hónapban legalább egyszer friss médiumba kell oltani.

A törzstenyészeteket a megfelelő tápoldatot tartalmazó kúpos lombikokban (körülbelül 100 ml-es űrtartalommal) kell szaporítani. Amikor az algákat 20 °C hőmérsékleten inkubálják folyamatos megvilágítás mellett, hetenkénti átoltás szükséges.

Az átoltás során bizonyos mennyiségű „régi” tenyészetet kell átvinni steril pipettákkal egy friss tápfolyadékot tartalmazó lombikba úgy, hogy a gyorsan növekvő fajták esetében a kezdeti koncentráció körülbelül a régi tenyészetnek a századrésze legyen.

Valamely fajta növekedési rátája a növekedési görbe segítségével határozható meg. Ha ez ismert, meghatározható az a sűrűség, amelynek elérésekor a tenyészetet át kell oltani. Ezt azelőtt kell végrehajtani, mielőtt a tenyészet eléri az elpusztulási fázist.

Előtenyészet:

Az előtenyészetnek megfelelő mennyiségű algát kell termelnie, amiket a vizsgált kultúráknál oltóanyagként lehet alkalmazni. Az előtenyészetet a kísérleti körülmények között inkubáljuk és akkor használjuk fel, amikor még exponenciálisan szaporodó fázisban van, szokásosan 2–4 napos inkubációs időszakot követően. Azon algatenyészeteket, amelyek deformálódtak vagy abnormális sejteket tartalmaznak, ki kell dobni.

▼M6

5. függelék

Adatelemzés nemlineáris regresszióval

Általános szempontok

Az algaszaporodási és más mikrobiológiai szaporodási vizsgálatokban a válasz – az élőanyag növekedése – természeténél fogva folyamatos, azaz metrikus változó. Folyamatsebesség, ha a szaporodási sebességet használjuk, illetve annak idő szerinti integrálja, ha az élőanyag tömegét választjuk. Mindkettő olyan nem kezelt, kontrollismétlésekben fellépő, megfelelő válasz átlagához van viszonyítva, amelyek maximálisan reagáltak az adott körülményekre – az algás vizsgálatoknál ezek közül meghatározó tényező a fény és a hőmérséklet. A rendszer statisztikai eloszlású, azaz homogén, és az élőanyag kontiniumnak tekinthető, nem pedig önálló sejteknek. Ilyen rendszereknél a jellemző válasz szórásnégyzet-eloszlása kizárólag a kísérleti tényezőktől (amelyeket jellemzően a log/normál vagy a normál hibaeloszlás ír le) függ. Ezzel szemben, a jellemző biológiai kísérletek kvantált adatokkal szolgálnak, amelyeknél az önálló organizmusok tűréséről (ami jellemzően binomiális eloszlású) gyakran feltételezik, hogy az a meghatározó komponens a szórásnégyzetben. A kontrollmintában fellépő hatások ekkor nullával, vagy a háttérszinttel egyenlőek.

Egyszerű esetben a normált vagy relatív válasz, r, monoton csökken 1-től (nulla gátlás) 0-ig (100 százalékos gátlás). Megjegyzendő, hogy minden hatással együtt jár egy belső hiba, és hogy a megjelenő negatív gátlások csak véletlen hiba eredményeként számolhatók.

Regressziószámítás

Minták

A regresszióanalízis célja, hogy egy matematikai regressziós függvény – Y=f(C), vagy még gyakrabban F(Z), ahol Z = log C – formájában mennyiségileg leírja a koncentráció-válasz görbét. A függvény inverze, a $C = f^{-1}(Y)$, segítségével kiszámíthatók az EC^x értékek, köztük az EC_{50}, EC_{10} és EC_{20}, valamint ezekre a 95 %-os megbízhatósághoz tartozó határok. Több egyszerű matematikai függvény bizonyítottan jól leírja az algákkal végzett szaporodásgátlási vizsgálatokban kapott koncentráció-válasz összefüggéseket. Ilyen függvény például a logisztikai egyenlet, az aszimmetrikus Weibull-egyenlet, és a log/normál eloszlási függvény, amelyek mind szigmoid görbék, melyek aszimptotikusan közelítenek 0-hoz, ha $C \rightarrow 0$- hoz, illetve 1-hez, ha $C \rightarrow$ a végtelenhez.

Újabban ajánlott a folytonos küszöbérték-függvényre alapuló modellek (mint pl. a Kooijman-modell a „populációnövekedés gátlására”, Kooijman és mtsai, 1996) használata, akár az aszimptotikus modellek alternatívájaként. Ez a modell feltételezi, hogy egy adott küszöbérték, EC_0+, alatt a koncentrációknak nincs hatása, és ennek a küszöbértéknek a meghatározása a koncentráció-válasz görbe egy, a kezdőpontban nem differenciálható egyszerű folyamatos függvény segítségével történő extrapolációjával és a koncentrációtengely metszésével történik.

Megjegyzendő, hogy az analízis lehet a legkisebb négyzetek összegének módszere (állandó szórásnégyzetet feltételezve), vagy a súlyozott legkisebb négyzetek módszere, ha a szórásnégyzet heterogenitása kompenzálva van.

Eljárás

Az eljárás vázlatosan a következő: Választani kell egy megfelelő függvényt, az Y = f(C) – t, és nem lineáris regresszióval rá kell illeszteni az adatpontokra. Lehetőség szerint az egyes lombikokból származó méréseket használjuk, ne pedig az ismétlések átlagait, hogy a lehető legtöbb információt nyerjük ki az adatokból.

▼M6

Ha viszont a szórásnégyzet értéke nagy, akkor a gyakorlati tapasztalatok azt mutatják, hogy az ismétlések átlagai szilárdabb matematikai becslést eredményezhetnek, amelyet csak kevéssé befolyásolnak az adatokban meglévő véletlen hibák, mint a minden egyes megtartott adatpont használata.

Az illesztett görbe és a mért adatok megszerkesztése után meg kell vizsgálni, hogy a görbe illeszkedése megfelelő-e. A különbségek elemzése különösen hasznos eszköz lehet erre a célra. Ha a koncentráció-válasz pontokra való illesztéshez választott függvény nem írja le jól a teljes görbét, vagy annak egy adott, alapvetően fontos részét – mint például a kis koncentrációknál jelentkező hatásokat –, akkor egy másik illesztési megoldást kell választani, a szimmetrikus helyett például aszimmetrikus görbét, mint pl. a Weibull-függvényt. Negatív gátlás esetén probléma lehet például a logaritmikus/normál eloszlási függvénnyel, ekkor szintén egy másik regressziófüggvényt kell használni. Az ilyen negatív értékek nullával vagy kis pozitív számmal történő helyettesítése nem ajánlott, mert torzítja a hibaeloszlást. Célravezetőbb lehet másik illesztést használni az érintett szakaszokra – például arra, ahol a szaporodásgátlás kismértékű –, egy adott EC_{lowx} érték meghatározása céljából. Az illesztési egyenletből ki kell számítani (inverz számítással, $C = f^{-1}(Y)$) az EC_x jellemző pontértékeit, és a mérési jegyzőkönyvben meg kell adni legalább az EC_{50}-re és egy vagy két EC_{lowx}-re kapott értékeket. A gyakorlati tapasztalat azt mutatja, hogy az algás vizsgálatok pontossága általában elfogadhatóan pontos becslést tesz lehetővé 10 %-os gátlási szinten, ha van elég adatpont – kivéve, ha zavaró tényezőként stimuláció fordul elő kis koncentrációknál. Az EC_{20}-becslés pontossága gyakran lényegesen jobb, mint az EC_{10}-é, mert az EC_{20} rendszerint a koncentráció-válasz görbe középső, közelítőleg lineáris szakaszára esik. A szaporodásstimuláció miatt néha nehéz az EC_{10}-et értelmezni. Összefoglalva, noha az EC_{10} általában kielégítő pontossággal meghatározható, mindig ajánlott az EC_{20} feltüntetése is a mérési jegyzőkönyvben.

Súlyozó tényezők

A tapasztalati szórásnégyzet általában nem állandó, és rendszerint tartalmaz egy proporcionális tagot, ezért előnyös rutinszerűen súlyozott regressziót végezni. Az ilyen analízishez használt súlyozó tényezők általában fordítottan arányosak a szórásnégyzettel:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Sok regresszióelemző programban lehetőség van a súlyozott regresszióanalízisre úgy, hogy a súlyozó tényezők egy táblázatban vannak felsorolva. Kényelmi szempontból a súlyozó tényezőket célszerű normálni, megszorozva őket $n/\Sigma w_i$-vel (ahol n az adatpontok száma), hogy az összegük egyenlő legyen 1-gyel.

A hatásváltozók normálása

A kontrollmintával kapott hatások átlagával történő normálás elvi problémákat vet fel és meglehetősen bonyolult szórásnégyzet-szerkezethez vezethet. Ha a szaporodásgátlás százalékos meghatározásához a kapott hatásértékeket elosztjuk a kontrollmintával kapott hatások átlagával, további hibát viszünk be, amit a kontrollminta átlagának hibája okoz. Ha ez a hiba nem elhanyagolhatóan kicsi, akkor a regresszióhoz és a megbízhatósági határokhoz használt súlyozó tényezőket korrigálni kell a kontrollminták kovarianciájával (Draper és Smith, 1981). Megjegyzendő, hogy nagyon fontos a kontrollmintákkal kapott hatásértékek becsült átlagának a pontossága, hogy a lehető legkisebb legyen a relatív válasz általános szórásnégyzete. Ez a szórásnégyzet a következő:

(az i alsó index az i-dik koncentrációkat, a 0 alsó index pedig a kontrollmintákat jelöli)

$$Yi = \text{Relatív hatás} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼**M6**

$Var(Y_i) = Var\ (r_i/r_0) \cong (\partial Yi\ /\ \partial\ r_i)^2 \cdot Var(r_i) + ((\partial\ Y_i/\ \partial\ r_0)^2 \cdot Var(r_0)$ szórásnégyzettel

és mivel $(\partial\ Y_i/\ \partial\ r_i) = 1/r_0$ and $(\partial\ Y_i/\ \partial\ r_0) = r_i/r_0^2$

normál eloszlású adatoknál és m_i és m_0 ismétlésekkel: $Var(ri) = \sigma^2/mi$

a relatív hatás, Y_i, teljes szórásnégyzete így a következő:

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

A kontrollminták átlagának hibája fordítottan arányos az átlagolt kontroll ismétlések számának négyzetgyökével, és néha indokolt lehet régebbi adatok is felhasználni és így nagymértékben csökkenteni a hibát. Más megoldásként mellőzhető az adatok normálása és az illesztést az abszolút hatásértékekre kell elvégezni, beleértve a kontrollminta hatásadatait is, de ekkor újabb paraméterként be kell vezetni a kontrollminta hatásértékét, amelyre nem lineáris regresszióval el kell végezni az illesztést. A szokásos 2-paraméteres regresszióegyenlet esetén ehhez a módszerhez 3 paraméter illesztése szükséges, és így több adatpontot igényel, mint az előre beállított kontrollminta-válasz segítségével normált adatokon végzett nem lineáris regresszió.

Inverz konfidenciaintervallumok

A nem lineáris regresszió konfidenciaintervallumainak inverz becsléssel történő kiszámítása meglehetősen bonyolult és a szokásos statisztikai számítógépes programcsomagokban ez a lehetőség nem is áll rendelkezésre. A körülbelüli megbízhatósági határok megkaphatók szokásos nem lineáris regressziós programmal, a paraméterek megváltoztatásával (Bruce és Versteeg, 1992), ami a matematikai egyenletnek az átírását jelenti a kívánt pontbecslésekkel, pl. az EC_{10}-zel és az EC_{50}-nel mint megbecsülendő paraméterekkel. (Legyen a függvény I = f (α, β, koncentráció) és a definiáló egyenletek, f (α, β, EC_{10}) = 0,1 és f (α, β, EC_{50}) = 0,5 felhasználásával helyettesítsük be az f (α, β, koncentráció) függvényt egy ekvivalens g (EC_{10}, EC_{50}, koncentráció) függvénnyel.

Közvetlenebb számítás (Andersen és mtsai, 1998) végezhető az eredeti egyenlet megtartásával és az r_i és r_0 átlagok körüli Taylor-sorfejtés felhasználásával.

Újabban a visszatevéses mintavételes (bootstrap) módszerek váltak népszerűvé. Ezek a módszerek mért adatokat, és véletlenszám-generátor által irányított gyakori mintavételt használnak a tapasztalati szórásnégyzet eloszlásának becslésére.

HIVATKOZÁSOK

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. A „GYORS” BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG MEGHATÁROZÁSA

I. RÉSZ ÁLTALÁNOS

1.1. BEVEZETÉS

Ez a leírás hat vizsgálati módszert ismertet, amelyek lehetővé teszik a kémiai anyagok szűrését a biológiailag könnyen végbemenő lebonthatóság szempontjából, valamely aerob vizes közegben.

a) Oldottszervesszén- („Dissolved Organic Carbon” = DOC) csökkenés (C.4-A. módszer);

b) Módosított OECD vizsgálat – DOC-csökkenés (C.4-B. módszer);

c) Szén-dioxid-fejlődés-vizsgálat (CO_2) (módosított Sturm-féle vizsgálat) (C.4.-C. módszer);

d) Manometrikus respirometria (C.4-D. módszer);

e) Zárt palack (C.4-E. módszer);

f) MITI (Ministry of International Trade and Industry – Japán) (C.4-F. módszer).

A módszer leírásának I. része ismerteti mind a hat vizsgálathoz tartozó általános és közös tételeket és megjegyzéseket. Az egyes módszerekre sajátosan jellemző tételek a II–VII. részben találhatók. A függelékek fogalommeghatározásokat, képleteket és iránymutató anyagokat tartalmaznak.

Egy 1988-ban, az OECD-országok laboratóriumaiban végrehajtott körvizsgálat azt mutatta, hogy a módszerek egymással egyező eredményeket adnak. Azonban a vizsgált anyag fizikai jellemzőitől függően a módszerek közül az egyik vagy a másik előnyben részesíthető.

1.2. A MEGFELELŐ MÓDSZER KIVÁLASZTÁSA

A legmegfelelőbb módszer kiválasztásához lényegesek a kémiai anyag oldhatóságára, gőznyomására és adszorpciós jellemzőire vonatkozó információk. Rendszerint ismerni kell a kémiai szerkezetet vagy a képletet a paraméterek, mint például a ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC, COD (lásd az 1. és 2. függeléket) elméleti értékeinek kiszámítására és/vagy mért értékeinek ellenőrzésére.

Azon vizsgált anyagok, amelyek vízben legalább 100 mg/l mértékben oldhatók, a fenti módszerek közül bármelyikkel kiértékelhetők, feltéve hogy nem illékonyak, és nem adszorbeálódnak. Az 1. táblázat tartalmazza a megfelelő módszereket azon kémiai anyagokhoz, amelyek vízben gyengén oldhatók, illékonyak vagy adszorbeálódnak. A 3. függelék írja le azt a módot, ahogyan a vízben gyengén oldható és illékony anyagok kezelhetők. Mérsékelten illékony kémiai anyagok a DOC-csökkenés módszerével vizsgálhatók, ha elegendő gáztér van a vizsgálati tartályokban (amelyeket megfelelően le kell zárni). Ezen esetben abiotikus kontrollt kell alkalmazni minden lehetséges fizikai veszteség figyelembevételére.

▼B

1. táblázat

A vizsgálati módszerek alkalmazhatósága

Vizsgálat	Analitikai módszer	Alkalmas olyan anyagokhoz, amelyek:		
		rosszul oldódnak	illékonyak	adszorbeálódnak
DOC- csökkenés	Oldott szerves szén	—	—	+/–
Módosított OECD-vizsgálat	Oldott szerves szén	—	—	+/–
CO_2-fejlődés-vizsgálat	Respirometria: CO_2-fejlődés	+	—	+
Manometrikus respirometria	Manometrikus respirometria: oxigénfogyasztás	+	+/–	+
Zárt palack	Respirometria: oldott oxigén	+/–	+	+
MITI-vizsgálat	Respirometria: oxigénfogyasztás	+	+/–	+

A kapott eredmények értelmezéséhez szükség van a vizsgált anyag tisztaságára vagy relatív arányaira vonatkozó információkra, különösen kismértékű lebonthatóság vagy szélsőséges eredmények esetén.

Nagyon hasznosnak bizonyulhatnak a vizsgált anyag baktériummal szembeni toxicitására vonatkozó információk (4. függelék), ezek lényegesek lehetnek az alacsony biológiai lebomlási értékek megfelelő értelmezéséhez.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Az eljárás ellenőrzéséhez a normál vizsgálatsorozattal egyidejűleg megfelelő lombik segítségével olyan referenciaanyagokat kell megvizsgálni, amelyek kielégítik a biológiailag gyors lebonthatóság kritériumait.

Alkalmas kémiai anyagok az anilin (frissen desztillált), a nátrium-acetát és a nátrium-benzoát. E referenciaanyagok közül mindegyik lebomlik ezen módszerekben, még akkor is, ha szándékosan nem történt inokulum-hozzáadás.

Javasolt olyan referenciaanyagot keresni, amely biológiailag gyorsan lebontható, de amelyhez szükség van valamilyen inokulum hozzáadására. A kálium-hidrogén-ftalátot javasolták, de további bizonyítékot kell beszerezni, mielőtt ezt elfogadnánk referenciaanyagként.

A respirometriás vizsgálatokban a nitrogéntartalmú vegyületek a nitrifikáció miatt hatással lehetnek az oxigénfelvételre (lásd a 2. és 5. függeléket).

I.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot ásványianyag-tápoldatban fel kell oldani vagy szuszpendálni, és aerob állapotok mellett, sötétben vagy diffúz fényben be kell oltani és inkubálni. A vizsgált oldatban az oltóanyagnak tulajdonítható DOC mennyiségét a vizsgált anyagnak tulajdonítható DOC-mennyiséggel összehasonlítva a lehető legalacsonyabban kell tartani. Figyelembe kell venni az inokulum endogén aktivitását egyidejűleg végzett vakpróbák segítségével, amelyek esetében az oldat csak inokulumot tartalmaz, de vizsgált anyagot nem, jóllehet, az anyag jelenlétében a sejtek endogén aktivitása nem fog pontosan megegyezni az endogén kontrollban jelentkező aktivitással. Egyidejűleg vizsgálni kell valamely referenciaanyagot az eljárások működésének ellenőrzésére.

▼B

Általában a lebomlást az olyan paraméterek meghatározása követi, mint például a DOC, a CO_2-képződés és az oxigénfelvétel, és elegendően gyakori időközönként méréseket kell végrehajtani a biológiai lebomlás kezdete és vége megállapításának lehetővé tételére. Automata respirométer alkalmazása esetén a mérés folyamatos. Más paramétereken kívül esetenként a DOC-ot is mérni kell, de ezt a mérést rendszerint csak a vizsgálat kezdetén és végén kell elvégezni. Specifikus kémiai elemzés is használható a vizsgált anyag elsődleges lebomlásának kiértékelésére és a képződött valamennyi közbenső anyag koncentrációjának meghatározására (kötelező a MITI-vizsgálatban).

A vizsgálat általában 28 napig tart. Azonban a vizsgálat befejezhető a 28. nap előtt, ha a biodegradációs görbe elért egy platót legalább három meghatározás során. A vizsgálatok 28 napon túlra is meghosszabbíthatók, amikor a biodegradációs görbe azt mutatja, hogy a biológiai lebomlás elkezdődött, de a plató (a vízszintes szakasz) elérése a 28. napig nem történt meg.

I.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

I.5.1. **Reprodukálhatóság**

A biológiai lebomlás természete és az inokulumként használt baktériumpopulációk sokfélesége miatt a meghatározásokat legalább kétszer kell végrehajtani.

Általános tapasztalat, hogy minél nagyobb a vizsgált oldószerhez kezdetben hozzáadott mikroorganizmusok koncentrációja, annál kisebb lesz az ismétlések közötti eltérés (szórás). A körvizsgálatok azt is bemutatták, hogy nagy eltérések lehetnek a különböző laboratóriumok által nyert eredmények között, de általában megegyezés tapasztalható a biológiailag könnyen lebontható vegyületeknél.

I.5.2. **A vizsgálat érvényessége**

A vizsgálat akkor tekinthető érvényesnek, ha a vizsgálat végén vagy a „tíznapos ablak” végén, az adott esettől függően, a platónál a vizsgált kémiai anyag eltávolításakor a vizsgálat megismétlésével kapott értékek szélső értékeinek különbsége kisebb mint 20 %, és ha a referenciaanyag százalékos lebomlása 14 nap alatt elérte a könnyű biológiai lebonthatóság szintjét. Ha ezek közül a feltételek közül valamelyik nem teljesül, meg kell ismételni a vizsgálatot. A módszerek szigorúsága miatt az alacsony értékek nem jelentik szükségképpen azt, hogy a vizsgált anyag biológiailag nem lebontható a környezeti feltételek mellett, hanem azt jelzi, hogy további vizsgálatokra lesz szükség a biológiai lebonthatóság meghatározására.

Ha valamely toxicitási vizsgálatban, amely mind a vizsgált anyagot, mind a referenciaanyagot tartalmazza, 35 %-nál kisebb lebomlás (a DOC alapján) vagy 25 %-nál kisebb lebomlás (a ThOD vagy $ThCO_2$ alapján) történt 14 nap alatt, a vizsgált kémiai anyagról feltételezhető, hogy annak gátló hatásai vannak (lásd a 4. függeléket is). A vizsgálatsorozatot meg kell ismételni, ha lehetséges, a vizsgált kémiai anyag kisebb koncentrációja és/vagy az inokulum nagyobb koncentrációja, de 30 mg szilárd anyag/liternél nem nagyobb koncentráció használatával.

I.6. ÁLTALÁNOS ELJÁRÁSOK ÉS ELŐKÉSZÜLETEK

A 2. táblázat foglalja össze a vizsgálatokra érvényes általános körülményeket. A kifejezetten az egyes vizsgálatokhoz tartozó készülékek és egyéb kísérleti körülmények leírása később, az adott vizsgálathoz tartozó címszó alatt olvasható.

▼B

2. táblázat:

Vizsgálati körülmények

Vizsgálat	DOC-csökkenés	CO_2-fejlődés	Manometrikus respirometria	Módositottt OECD-vizsgálat	Zárt palack	MITI (I)
A vizsgálat anyag koncentracioja						
mg/l			100		2-10	100
mg DOC/1	10-40	10-20		10-40		
MG ThOD/1			50-100		5-10	
Az inoklum koncentrációja (sejt/l, megközelítő érték	≤ 30 mg/l SS vagy ≤ 100 ml kifolyó szennyvíz/liter (10^7 – 10^8)			0,5 ml másodlagos szennyvíz/l (10^5)	≤ 5 ml kifolyó szennyvíz/l (10^4 – 10^6)	30 mg/l SS (10^7 - 10^8)
Elemek koncentrációja ásványi oldószerben (mg/l-ben)						
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					Lehetőleg 7,0
Hőmérséklett	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = Dissolved organic Carbon (oldott szerves szén) ThoD = Theoretical Oxygen Demand (elméleti oxigénigény) SS = Suspended Solids (Szuszpendált szilárd anyagok)

I.6.1. **Hígítóvíz**

Toxikus anyagok (például Cu^{++} ionok) gátló hatással járó koncentrációitól mentes ioncserélt vagy desztillált vizet kell használni. E víznek nem szabad a vizsgált anyag által bevitt szerves széntartalom 10 %-ánál többet tartalmaznia. A vizsgált víz nagy tisztaságára a nagy vakpróbaértékek kiküszöböléséhez van szükség. A szennyeződés származhat a saját szennyeződésekből, valamint az ioncserélő műgyantákból és a baktériumból vagy algából származó roncsolt anyagból is. Minden egyes vizsgálatsorozathoz csak egyetlen adag vizet kell használni, amelyet előzőleg DOC-elemzéssel kell ellenőrizni. Ilyen ellenőrzésre nincs szükség a zárt palack vizsgálathoz, de a víz oxigénfogyasztásának alacsonynak kell lennie.

▼B

I.6.2. **Az ásványianyag-tápoldat törzsoldatai**

A vizsgált oldatok elkészítéséhez megfelelő koncentrációjú ásványianyag-tápoldatokat tartalmazó törzsoldatokat kell készíteni. A következő törzsoldatok használhatók (különböző hígítási arányokkal) a DOC-csökkenés, a módosított OECD, a CO_2-fejlődési, a manometrikus respirometriás és a zártpalackos vizsgálati módszerekhez.

A hígítási arányok és a MITI-vizsgálat során alkalmazandó ásványianyag-tápoldat elkészítése az adott vizsgálatok leírásában olvasható.

Törzsoldatok:

A következő törzsoldatokat kell elkészíteni analitikai tisztaságú reagensek segítségével.

a)	Kálium-dihidrogén-foszfát, KH_2PO_4	8,50g
	Dikálium-hidrogén-foszfát, K_2HPO_4	21,75g
	Dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrát, $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$	33,40g
	Ammónium-klorid, NH_4Cl	0,50g
	Ezen anyagokat fel kell oldani vízben, és kiegészíteni 1 literre. Az oldat pH-jának 7,4-nek kell lennie.	
b)	Kalcium-klorid, vízmentes, $CaCl_2$	27,50g
	or vagy kalcium-klorid-dihidrát, $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	36,40g
	Ezen anyagokat fel kell oldani vízben, és kiegészíteni 1 literre.	
c)	Magnézium-szulfát-heptahidrát, $MgSO_4 . 7 H_2O$	22,50g
	Ezt az anyagot fel kell oldani vízben, és kiegészíteni 1 literre.	
d)	Vas(III)-klorid-hexahidrát, $FeCl_3 . 6H_2O$	0,25g
	Ezt az anyagot fel kell oldani vízben, és kiegészíteni 1 literre.	

Megjegyzés: azért, hogy ne kelljen közvetlenül a használat előtt előkészíteni ezen oldatot, hozzá kell adni literenként egy csepp tömény HCl-ot vagy 0,4 gramm etilén-diamin-tetra-ecetsav-dinátrium-sót (EDTA).

I.6.3. **Kémiai anyagok törzsoldatai**

Ha az oldhatóság túllépi az 1 g/litert, akkor fel kell oldani szükség szerint 1–10 gramm vizsgált vagy referenciaanyagot ioncserélt vízben, és ezt ki kell egészíteni 1 literre. Egyébként a törzsoldatokat ásványianyag-tápoldatban kell elkészíteni, vagy közvetlenül az ásványianyag-tápoldathoz kell hozzáadni a vizsgált anyagot. A kevésbé oldható kémiai anyagok kezelésének módját a 3. függelék tartalmazza, de a MITI-vizsgálat (C.4-F. módszer) esetében sem oldószereket, sem pedig emulgálószereket nem kell használni.

▼B

I.6.4. **Inokulum**

Az inokulum különféle forrásokból származhat: lehet eleveniszap, szennyvíztisztítóból kifolyt víz (nem klórozott), felszíni víz és talaj, vagy ezek vegyesen. A DOC-csökkenés, a CO_2-fejlődés és a manometrikus respirometriás vizsgálatok esetében, ha eleveniszapot használnak, azt döntően háztartási szennyvizet befogadó szennyvíztisztító telepből vagy egységből kell venni. Más forrásokból származó inokulumokkal kapcsolatban bebizonyosodott, hogy ezek az eredmények nagyobb szórását adják. A módosított OECD- és a zártpalack-vizsgálat esetében több hígított inokulumra van szükség, iszappehely nélkül, és az előnyben részesített forrás a háztartási szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telepből vagy egységből származó szennyvíz. A MITI-vizsgálathoz az inokulum több forrásból származik, ezek ismertetése e vizsgálat leírásában olvasható.

I.6.4.1. *Eleveniszapból származó inokulum*

Az eleveniszap-mintát frissen kell összegyűjteni valamely, döntő részben háztartási szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telep vagy egység levegőztetőtartályából. Ha szükséges, el kell távolítani a durva részecskéket azáltal, hogy finom szűrőn keresztül szűrik át a vizsgált mintát, ezután aerob módon kell tárolni az iszapot.

Másik szóba jöhető megoldás: a durva részecskék eltávolítása után az iszapot ülepíteni vagy centrifugálni kell (például 1 100 g mellett 10 percen át). A felülúszó folyadékot el kell távolítani. Az iszap mosható ásványianyag-tápoldatban. A koncentrált iszapot az ásványianyag-tápoldatban kell szuszpendáltatni, a 3–5 gramm szuszpendált szilárd anyag/liter koncentráció elérése érdekében, majd levegőztetni kell, amíg szükséges.

Az iszapot megfelelően működő hagyományos üzemből kell venni. Ha az iszapot nagysebességű szennyvíztisztító telepről kell begyűjteni, vagy az vélhetően tartalmaz gátlószereket, mosni kell az iszapot. Alapos keverés után le kell ülepíteni vagy centrifugálni kell az újraszuszpendált iszapot, el kell távolítani a felülúszó folyadékot, és újra kell szuszpendáltatni a mosott iszapot további ásványianyag-tápoldatban. Ezt az eljárást addig kell ismételni, amíg az iszap többlet szubsztráttól vagy gátlószertől mentesnek nem tekinthető.

A teljes újraszuszpendálódás elérése után, vagy nem kezelt iszap esetében közvetlenül a használat előtt kell mintát venni a szuszpendált szilárd részecskék száraz tömegének meghatározására.

További alternatíva az eleveniszap homogenizálása (3–5 gramm szuszpendált szilárd anyag/liter). Az iszapot mechanikus keverőgépben 2 percen át közepes fordulatszámmal kell keverni. Le kell ülepíteni a megkevert iszapot 30 percig, vagy ha szükséges, hosszabb ideig, és le kell szűrni a folyadékot 10 ml/l ásványianyag-tápoldatot tartalmazó inokulumként való használatra.

I.6.4.2. *Egyéb inokulumforrások*

E források döntően háztartási szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telep vagy egység másodlagos kezelt szennyvízéből származhatnak. Friss mintákat kell gyűjteni, és azokat levegővel érintkezve tartani a szállítás során. A mintákat 1 órán át kell ülepedni hagyni, vagy durva szűrőpapíron át kell szűrni, a leszűrt kezelt szennyvizet vagy filtrátumot levegővel érintkezve kell tartani. Ásványianyag-tápoldat literenként legfeljebb 100 ml ilyen típusú inokulum használható.

▼B

További inokulumforrás a felszíni víz. Ebben az esetben megfelelő felszíni vízmintát kell begyűjteni, például folyóból, tóból, és a felhasználásig levegővel érintkezve kell tartani. Ha szükséges, az inokulumot szűréssel vagy centrifugálással lehet sűríteni.

I.6.5. **Az inokulum előkondicionálása**

Az inokulum előkondícionálható a kísérleti körülményekhez, de nem adaptálható előre a vizsgált anyaghoz. Az előkondicionálás az eleveniszapnak ásványianyag-tápoldatban vagy másodlagos szennyvízben 5–7 napon keresztüli, a vizsgálati hőmérsékleten végrehajtott levegőztetéséből áll. Az előkondicionálás esetenként javítja a vizsgálati módszerek pontosságát a vakpróba értékek csökkentésével. Szükségtelennek tekinthető a MITI-inokulum előkondicionálása.

I.6.6. **Abiotikus kontrollok**

Amikor szükséges, ellenőrizni kell a vizsgált anyag esetleges abiotikus lebomlását inokulumot nem tartalmazó, steril kontrollokban a DOC-csökkenés, oxigénfelvétel vagy szén-dioxid-fejlődés meghatározásával. A sterilizáció membránszűrés útján (0,2 – 0,45 mikrométer) vagy megfelelő koncentrációjú, alkalmas toxikus anyag hozzáadásával történik. Ha membránszűrést alkalmaznak, aszeptikusan kell mintákat venni a steril körülmények megőrzése érdekében. Ha előzőleg még nem zártuk ki a vizsgált anyag adszorpcióját, akkor azon vizsgálatoknak, amelyek a DOC csökkeneséként mérik a biológiai lebomlást, különösen eleveniszap inokulummal, tartalmazniuk kell beoltott és toxikus anyagot tartalmazó abiotikus kontrollt.

I.6.7. **A lombikok száma**

Az egyes vizsgálatsorozatokban használandó lombikok számát az egyes vizsgálatok leírásai ismertetik.

A következő típusú lombikokat kell használni:

— vizsgált szuszpenzió: vizsgált anyagot és inokulumot tartalmaz,

— inokulum-vakpróba: csak inokulumot tartalmaz,

— eljáráskontroll: referenciaanyagot és inokulumot tartalmaz,

— abiotikus steril kontroll: steril, csak vizsgált anyagot tartalmaz (lásd az I.6.6. pontot),

— adszorpciós kontroll: vizsgált anyagot, inokulumot és sterilizáló szert tartalmaz,

— toxicitáskontroll: vizsgált anyagot, referenciaanyagot és inokulumot tartalmaz.

A vizsgált szuszpenzióban és az inokulum-vakpróbában a meghatározásnak feltétlenül egyidejűleg kell történnie. A többi lombikban is ajánlott egyidejűleg elvégezni a meghatározásokat.

Ez azonban nem mindig lehetséges. Gondoskodni kell arról, hogy elegendő minta vagy mért érték álljon rendelkezésre a „tíznapos ablakban” a százalékos csökkenés kiértékelésének lehetővé tételére.

▼B

I.7. ADATOK ÉS KIÉRTÉKELÉS

A D_t (százalékos lebomlás) számításához mind a vizsgálati tartályokban, mind az inokulum-vakpróbában a paraméter kétszeri mérésének átlagát kell használni. A képleteket a későbbiekben ismertetett, az egyes vizsgálatokkal foglalkozó szakaszok tartalmazzák. A lebomlás folyamata grafikus ábrázolásban látható, és bemutatásra kerül a „tíznapos ablak". Ki kell számítani és megadni a jelentésben a „tíznapos ablak" végén, a platónál vagy a vizsgálat végén elért százalékos csökkenés mértékét, az adott esetnek megfelelően.

A respirometriás vizsgálatokban a nitrogéntartalmú vegyületek a nitrifikáció miatt hatással lehetnek az oxigénfelvételre (lásd a 2. és 5. függeléket).

I.7.1. **DOC-meghatározás segítségével mért lebomlás**

A D_t százalékos lebomlást minden alkalommal, amikor mintavétel történt, külön kell kiszámítani a vizsgált anyagot tartalmazó lombikokhoz a kettős DOC-mérések átlagértékeit használva, hogy megítélhető legyen a vizsgálat érvényessége (lásd az I.5.2. pontot). A következő egyenlet szolgál ennek kiszámítására:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

ahol:

D_t = százalékos lebomlás a t időpontban,

G_o = a beoltott, a vizsgált anyagot tartalmazó ásványianyag-tápoldatban a DOC-koncentrációk kezdeti átlagértéke (mg DOC/l),

C_t = a beoltott, a vizsgált anyagot tartalmazó ásványianyag-tápoldatban a DOC-koncentrációk átlagértéke t időpontban (mg DOC/l),

C_{bo} = a vakpróba beoltott ásványianyag-tápoldatban a DOC-koncentrációk kezdeti átlagértéke (mg DOC/l),

C_{bt} = a vakpróba beoltott ásványianyag-tápoldatban a DOC-koncentrációk átlagértéke t időpontban (mg DOC/1).

Minden koncentráció mérése kísérleti úton történik.

I.7.2. **Specifikus analízis segítségével mért lebomlás**

Amikor rendelkezésre állnak specifikus analitikai adatok, a következő képletből lehet kiszámítani az elsődleges biológiai lebomlást:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

ahol:

D_t = % lebomlás t időpontban, általában a 28. napon,

S_a = a vizsgált anyag maradékmennyisége a vizsgálat végén a beoltott közegben, (mg),

S_b = a vizsgált anyag maradékmennyisége a vakpróbában olyan vízzel/táptalajjal végrehajtott vizsgálat után, amelyhez csak a vizsgált anyagot adtuk hozzá (mg).

▼B

I.7.3. **Abiotikus lebomlás**

Abiotikus steril kontroll használatakor a következő képlet segítségével kell kiszámítani a százalékos abiotikus bomlást.

$$\% \text{ abiotikus bomlás} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

ahol:

$C_{s(o)}$ = DOC-koncentráció a steril kontrollban a 0. napon

$C_{s(t)}$ = DOC-koncentráció a steril kontrollban a t-dik napon

I.8. JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— a vizsgált és referenciaanyagokat és azok tisztaságát,

— a vizsgálati körülményeket,

— az inokulumot: minősége és a mintavétel helyszíne(i), koncentrációja és minden előkondícionáló kezelés,

— a szennyvízben jelen lévő ipari hulladék arányát és minőségét, ha ismert,

— a vizsgálati időtartamot és hőmérsékletet,

— rosszul oldható vizsgált anyagok esetében a végrehajtott kezelést,

— az alkalmazott vizsgálati módszert: az eljárás minden változtatását tudományosan meg kell indokolni,

— az adatlapot,

— minden megfigyelt gátlási jelenséget,

— minden megfigyelt abiotikus lebomlást,

— specifikus analitikai adatokat, ha rendelkezésre állnak,

— köztes anyagok analitikai adatait, ha rendelkezésre állnak,

— a százalékos lebomlásnak az idő függvényében ábrázolt görbéjét a vizsgált és referenciaanyagokhoz elkészítve; a lappangási fázist, lebomlási fázist, tíznapos ablakot és a meredekséget világosan jelezni kell (1. függelék). Ha a vizsgálat megfelelt az érvényességi követelményeknek, a vizsgált anyagot tartalmazó lombikok lebomlási százalékainak átlagértéke használható a görbe elkészítéséhez,

— a százalékos csökkenést a „tíznapos ablak” után és a platón vagy a vizsgálat végén.

II. RÉSZ **DOC (OLDOTT SZERVES SZÉN) CSÖKKENÉSÉNEK VIZSGÁLATA** (C.4-A. Módszer)

II.1. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Egyetlen szervesszén-forrásként a vizsgált anyag ismert koncentrációját (10–40 mg DOC/l) tartalmazó, beoltott ásványianyag-tápoldat mért mennyiségét sötétben vagy szórt fényben 22 ± 2 °C hőmérsékleten kell levegőztetni.

▼B

A lebomlást 28 napos időtartam során gyakori időközönként végrehajtott DOC-elemzés követi. A biológiai lebomlás mértékét a DOC-koncentrációjának csökkenéséből (az inokulum-vakpróba figyelembevételével) a kezdetben jelen lévő koncentráció százalékában kell kiszámítani. Az elsődleges biológiai lebomlás mértéke az inkubációs periódus kezdetén és végén végrehajtott kiegészítő kémiai analízisből is kiszámítható.

II.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

II.2.1. **Készülék**

a) Kúpos lombikok, például 250 ml-től 2 l-ig, a DOC-analízishez szükséges térfogattól függően;

b) kúpos lombikok fogadására alkalmas rázógép, amelyet vagy termosztáttal kell felszerelni, vagy klimatizált helyiségben kell használni; követelmény, hogy az aerob állapotok minden lombikban fenntarthatók legyenek;

c) szűrőkészülék, alkalmas membránokkal;

d) DOC-analizátor;

e) oldott oxigén meghatározására szolgáló készülék;

f) centrifuga.

II.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A törzsoldatok elkészítését lásd az I.6.2. pontban.

10 ml (a) oldatot 800 ml hígítóvízzel kell összekeverni, 1 ml (b)–(d) oldatot kell hozzáadni, majd 1 literre hígítóvízzel kiegészíteni.

II.2.3. **Inokulum előkészítése és előkondicionálása**

Az inokulum különféle forrásokból származhat: lehet eleveniszap, szennyvíztisztítóból kifolyt víz, felszíni víz és talaj vagy ezek vegyesen.

Lásd az I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. és I.6.5. pontot.

II.2.4. **A lombikok előkészítése**

Példa: 800 ml-es adagokban 2 literes kúpos lombikokba ásványianyag-tápoldatot kell bevinni, ezekhez a vizsgált és referenciaoldatok törzsoldataiból elegendő mennyiséget kell hozzáadni úgy, hogy 10–40 mg DOC/l-rel egyenlő koncentrációt kapjanak. A pH-értéket ellenőrizni kell, és ha szükséges, 7,4-re kell beállítani. A lombikokat eleveniszappal vagy más forrásból származó inokulummal kell beoltani (lásd az I.6.4. pontot) úgy, hogy 30 mg szuszpendált szilárd anyag/liternél nem nagyobb végleges koncentrációt kapjanak. Ezenkívül inokulumkontrollokat kell készíteni ásványianyag-tápoldatban, vizsgált vagy referenciaanyagok nélkül.

Ha szükséges, használni lehet egy tartályt a vizsgált anyag lehetséges gátló hatásának ellenőrzésére olyan oldat oltásával, amely az ásványianyag-tápoldatban, mind a vizsgált, mind valamely referenciaanyag hasonló koncentrációit tartalmazza.

Ezenkívül, ha szükséges, egy további, steril lombik is alkalmazható az anyag nem beoltott oldatának segítségével annak ellenőrzésére, hogy lebomlott-e abiotikusan a vizsgált anyag (lásd az I.6.6. pontot).

▼B

Ha a vizsgált anyagról gyanítható, hogy jelentős mértékben adszorbeálódik az üvegen, iszapban stb., akkor előzetes vizsgálatot kell végezni az adszorpció valószínű mértékének és a kísérlet alkalmasságának meghatározására (lásd az 1. táblázatot). Elő kell készíteni egy, a vizsgált anyagot, inokulumot és sterilizálószert tartalmazó lombikot.

Minden lombikban ki kell pótolni a térfogatot 1 literre ásványianyag-tápoldattal, és keverés után mintát kell venni mindegyikből a DOC kezdeti koncentrációjának meghatározására (lásd a 2. függelék 4. pontját). Le kell fedni a lombikok nyílását például alufóliával úgy, hogy szabad légcsere jöhessen létre a lombik és a környezete között. Ezután a lombikokat rázógépbe kell helyezni, és el kell kezdeni a vizsgálatot.

II.2.5. **Lombikok száma egy tipikus vizsgálatsorozatban**

1. és 2. lombik: vizsgált szuszpenzió

3. és 4. lombik: inokulum-vakpróba

5. lombik: eljáráskontroll

Ajánlott és amikor szükséges:

6. lombik: abiotikus steril kontroll

7. lombik: adszorpciós kontroll

8. lombik: toxicitáskontroll

Lásd még az I.6.7. pontot is.

II.2.6. **A kísérlet végrehajtása**

A kísérlet során mindvégig kétszer kell meghatározni a DOC koncentrációit minden egyes lombikban olyan ismert időközönként, amely elegendően gyakori meghatározást biztosít ahhoz, hogy megállapítható legyen a „tíznapos ablak” kezdete és a százalékos csökkenés a „tíznapos ablak” végén. A vizsgált szuszpenzióból csak az egyes meghatározásokhoz szükséges minimális mennyiséget kell kivenni.

Mintavétel előtt, ha szükséges, a lombikokban pótolni kell az elpárolgott veszteséget, megfelelő mennyiségű hígítóvíz (I.6.1.) hozzáadásával. Az ásványianyag-tápoldatot alaposan meg kell keverni a mintavétel előtt, és gondoskodni kell arról, hogy a tartályok falához hozzátapadt anyag mintavétel előtt feloldódjon vagy szuszpendálódjon. Közvetlenül a mintavétel végrehajtása után szűrésre van szükség membránszűrővel vagy centrifugálással (lásd a 2. függelék 4. pontját). A szűrt vagy centrifugált mintákat még ugyanazon a napon kell analizálni, ellenkező esetben 2–4 °C hőmérsékleten kell tárolni maximum 48 órán át vagy –18 °C alatti hőmérsékleten hosszabb időtartamig.

II.3. ADATOK ÉS JELENTÉS

II.3.1. **Az eredmények kiértékelése**

Ki kell számítani a százalékos lebomlást a t időpontban az 1.7.1. (DOC-meghatározás), és választható módon az 1.7.2. (specifikus analízis) pontban megadottaknak megfelelően.

Minden eredményt fel kell jegyezni a megadott adatlapokon.

▼B

II.3.2. **Az eredmények érvényessége**

Lásd az I.5.2. pontot.

II.3.3. **Vizsgálati jelentés**

Lásd az I.8. pontot.

II.4. ADATLAP

Példa az adatlapra.

DOC-CSÖKKENÉS VIZSGÁLATA

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat-koncentráció: … mg/l, az anyagra vonatkoztatva

Kezdeti koncentráció a közegben, t_0: … mg/l az anyagra vonatkoztatva

4. **INOKULUM**

Forrás:

Végrehajtott kezelés:

Előkondicionálás, ha van ilyen:

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja a reakciókeverékben: … mg/l

5. **SZÉNANALÍZIS**

Szénanalizátor:

	Lombik száma		DOC n nap után (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Vizsgált kémiai anyag + inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, átlag $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, átlag $C_{b(t)}$					

▼B

	Lombik száma		DOC n nap után (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Vakpróba-inokulum vizsgált anyag nélkül	3	c_1					
		c_2					
		c, átlag $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, átlag $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ALAPADATOK KIÉRTÉKELÉSE**

Lombik száma		% lebomlás n nap után				
		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				
Átlag (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) A D_1-et és D_2-t nem szabad átlagolni, ha jelentős eltérés van közöttük.

Megjegyzés: hasonló adatlapok használhatók a referenciaanyagokhoz és a toxicitáskontrollokhoz is.

7. **ABIOTIKUS KONTROLL** (választható)

	Idő (nap)	
	0	t
DOC-koncentráció (mg/l) steril kontrollban	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotikus lebomlás} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIKUS ANALÍZIS** (választható)

	A vizsgált kémiaianyag-maradék mennyisége a vizsgálat végén (mg/l)	% elsődleges lebomlás
Steril kontroll	S_b	

▼B

	A vizsgált kémiaianyag-maradék mennyisége a vizsgálat végén (mg/l)	% elsődleges lebomlás
Beoltott vizsgált közeg	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

III. RÉSZ **MÓDOSÍTOTT OECD-VIZSGÁLAT (DOC-CSÖKKENÉS)** (C.4-B. Módszer)

III.1. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Egyetlen szerves szénforrásként a vizsgált anyag ismert koncentrációját (10–40 mg DOC/l) tartalmazó beoltott ásványi oldószer mért mennyiségét sötétben vagy szórt fényben 22 ± 2 °C hőmérsékleten kell levegőztetni.

A lebomlást egy 28 napos időtartam során gyakori időközönként végrehajtott DOC-elemzés követi. A biológiai lebomlás mértékét a DOC koncentrációjának csökkenéséből, (az inokulum-vakpróba figyelembevételével) a kezdetben jelen lévő koncentráció százalékában kell kiszámítani. Az elsődleges biológiai lebomlás mértéke az inkubációs periódus kezdetén és végén végrehajtott kiegészítő kémiai analízisből is kiszámítható.

III.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

III.2.1. Készülék

a) Kúpos lombikok, például 250 ml-től 2 l-ig, a DOC-analízishez szükséges térfogattól függően;

b) rázógép a kúpos lombikok behelyezésére, amelyet vagy termosztáttal kell felszerelni, vagy klimatizált helyiségben kell használni, követelmény, hogy az aerob állapotok minden lombikban fenntarthatók legyenek;

c) szűrőkészülék, alkalmas membránokkal;

d) DOC-analizátor;

e) oldott oxigén meghatározására szolgáló készülék;

f) centrifuga.

III.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A törzsoldatok elkészítését lásd az I.6.2. pontban.

10 ml (a) oldatot 800 ml hígítóvízzel kell összekeverni, 1 ml (b)–(d) oldatot kell hozzáadni, majd 1 literre hígítóvízzel kiegészíteni.

E módszer literenként csak 0,5 ml kezelt szennyvizet használ inokulumként, ezért lehetséges, hogy meg kell erősíteni a közeget nyomelemekkel és növekedési faktorokkal. Ez a következő oldatok mindegyikéből 1 ml hozzáadásával történik 1 liter végső közeghez:

▼B

Nyomelemoldat:

Mangán-szulfát-tetrahidrát, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Borsav, H_3BO_3	57,2 mg
Cink-szulfát-heptahidrát, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
Ammónium-heptamolibdát $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Fe-keLát ($FeC1_3$ etiléndiamin-tetra-ecetsav)	100,0 mg
Ezen anyagokat fel kell oldani, és kipótolni 1 000 ml-re hígítóvízzel	
Vitaminoldat:	
Élesztőkivonat	15,0 mg

Az élesztőkivonatot fel kell oldani 100 ml vízben. Sterilizálni kell 0,2 mikrométer pórusméretű membránon keresztülvezetve, vagy frissen kell elkészíteni.

III.2.3. **Inokulum előkészítése és előkondicionálása**

Az inokulum döntően háztartási szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telep vagy egység másodlagos, kezelt szennyvízéből származik. Lásd az I.6.4.2. és az I.6.5. pontot.

A felhasznált mennyiség 0,5 ml/liter ásványianyag-tápoldat.

III.2.4. **A lombikok előkészítése**

Példa: 800 ml-es adagokban 2 literes kúpos lombikokba ásványianyag-tápoldatot kell bevinni, ezekhez a vizsgált- és referenciaoldatok törzsoldataiból elegendő mennyiséget kell hozzáadni úgy, hogy 10–40 mg DOC/l-rel egyenlő koncentrációt kapjanak. Ellenőrizni kell a pH-értéket, és ha szükséges, 7,4-re kell beállítani. A lombikokat kezelt szennyvízzel kell beoltani (lásd az I.6.4.2. pontot) 0,5 ml/l koncentráció mellett.

Ezenkívül inokulumkontrollokat kell készíteni ásványianyag-tápoldatban, vizsgált- vagy referenciaanyagok nélkül.

Ha szükséges, használni lehet egy tartályt a vizsgált kémiai anyag lehetséges gátló hatásának ellenőrzésére olyan oldat oltásával, amely az ásványi közegben, mind a vizsgált, mind valamely referenciaanyag hasonló koncentrációit tartalmazza. Ezenkívül, ha szükséges, egy további, steril lombik is alkalmazható az anyag nem beoltott oldatának segítségével annak ellenőrzésére, hogy lebomlott-e abiotikusan a vizsgált anyag (lásd az I.6.6. pontot).

Ha a vizsgált anyagról gyanítható, hogy jelentős mértékben adszorbeálódik az üvegen, iszapban stb., akkor előzetes vizsgálatot kell végezni az adszorpció valószínű mértékének és a kísérlet alkalmasságának meghatározására (lásd az 1. táblázatot). Elő kell készíteni egy, a vizsgált anyagot, inokulumot és sterilizálószert tartalmazó lombikot.

Minden lombikban ki kell pótolni a térfogatot 1 literre ásványianyag-tápoldattal, és a keverés után mintát kell venni minden egyes lombikból a DOC kezdeti koncentrációjának meghatározására (lásd a 2. függelék 4. pontját). Le kell fedni a lombikok nyílását például alufóliával úgy, hogy szabad légcsere jöhessen létre a lombik és a környezete között. Ezután a lombikokat rázógépbe kell helyezni, és el kell kezdeni a vizsgálatot.

▼B

III.2.5. **A lombikok száma egy tipikus vizsgálatsorozatban**

1. és 2. lombik: vizsgált szuszpenzió

3. és 4. lombik: inokulum-vakpróba

5. lombik: eljáráskontroll

Ajánlott és amikor szükséges:

6. lombik: abiotikus steril kontroll

7. lombik: adszorpciós kontroll

8. lombik: toxicitáskontroll

Lásd még az I.6.7. pontot is.

III.2.6. **A vizsgálat végrehajtása**

A vizsgálat során mindvégig kétszer kell meghatározni a DOC koncentrációit minden egyes lombikban olyan ismert időközönként, amely elegendően gyakori meghatározást biztosít ahhoz, hogy megállapítható legyen a „tíznapos ablak” kezdete és a százalékos csökkenés a „tíznapos ablak” végén. A vizsgált szuszpenzióból csak az egyes meghatározásokhoz szükséges minimális mennyiséget kell kivenni.

Mintavétel előtt, ha szükséges, a lombikokban pótolni kell az elpárolgott veszteséget megfelelő mennyiségű hígítóvíz (1.6.1.) hozzáadásával. Az ásványianyag-tápoldatot alaposan meg kell keverni a mintavétel előtt, és gondoskodni kell arról, hogy a tartályok falához hozzátapadt anyag mintavétel előtt feloldódjon vagy szuszpendálódjon. Közvetlenül a mintavétel végrehajtása után szűrésre van szükség membránszűrővel vagy centrifugálással (lásd a 2. függelék 4. pontját). A szűrt vagy centrifugált mintákat még ugyanazon a napon kell analizálni, ellenkező esetben 2–4 °C hőmérsékleten kell azt tárolni maximum 48 órán át vagy –18 °C alatti hőmérsékleten hosszabb időtartamig.

III.3. ADATOK ÉS JELENTÉS

III.3.1. **Az eredmények kiértékelése**

Ki kell számítani a százalékos lebomlást a t időpontban az I.7.1. (DOC meghatározás), és választható módon az I.7.2. (specifikus analízis) pontban megadottaknak megfelelően.

Minden eredményt fel kell jegyezni a megadott adatlapokon.

III.3.2. Az eredmények érvényessége

Lásd az I.5.2. pontot.

III.3.3. Vizsgálati jelentés

Lásd az I.8. pontot.

III.4. ADATLAP

Példa az adatlapra.

MÓDOSÍTOTT OECD-VIZSGÁLAT

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

▼B

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat-koncentráció: … mg/l, az anyagra vonatkoztatva

Kezdeti koncentráció a médiumban: … mg/l az anyagra vonatkoztatva

4. **INOKULUM**

Forrás:

Végrehajtott kezelés:

Előkondicionálás, ha van ilyen:

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja a reakciókeverékben: … mg/l

5. SZÉNANALÍZIS

Szénanalizátor:

	Lombik száma		DOC n nap után (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Vizsgált kémiai anyag + inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, átlag $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, átlag $C_{b(t)}$					
Vakpróba-inokulum vizsgált anyag nélkül	3	c_1					
		c_2					
		c, átlag $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, átlag $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ALAPADATOK KIÉRTÉKELÉSE**

Lombik száma		% lebomlás n nap után				
		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

Lombik száma		% lebomlás n nap után				
		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				
Átlag (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) A D_1-et és D_2-t nem szabad átlagolni, ha jelentős eltérés van közöttük.

Megjegyzés: hasonló adatlapok használhatók a referenciaanyagokhoz és a toxicitáskontrollokhoz is.

7. **ABIOTIKUS KONTROLL** (választható)

	Idő (nap)	
	0	t
DOC-koncentráció (mg/l) steril kontrollban	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotikus lebomlás} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIKUS ANALÍZIS** (választható)

	A vizsgált kémiaianyag-maradék mennyisége a vizsgálat végén (mg/l)	% elsődleges lebomlás
Steril kontroll	S_b	
Beoltott vizsgált közeg	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

IV. RÉSZ **CO_2-FEJLŐDÉS-VIZSGÁLAT** (C.4-C. módszer)

IV.l. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Kizárólagos szerves szénforrásként a vizsgált anyag ismert koncentrációját (10–20 mg DOC vagy TOC/l) tartalmazó, definiált térfogatú beoltott ásványianyag-tápoldatot szabályozott átfolyási sebesség mellett, szén-dioxid-mentes levegő átvezetésével, sötétben vagy szórt fényben levegőztetni kell. A lebomlást 28 napon át kell követni a termelt szén-dioxid meghatározásával, amelyet bárium- vagy nátrium-hidroxidban kell elnyeletni, és amelyet a maradék hidroxid titrálásával vagy szervetlen szénként kell mérni. A vizsgált anyagból előállított szén-dioxid-mennyiséget (a vakpróba-inokulumból származó mennyiség figyelembevételével helyesbítve) a $ThCO_2$ százalékaként kell kifejezni. A biológiai lebomlás mértéke az inkubációs periódus kezdetén és végén végrehajtott kiegészítő DOC-analízisből is kiszámítható.

▼B

IV.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

IV.2.1. **Készülék**

a) 2–5 literes lombikok, mindegyik egy, csaknem a tartály aljáig érő levegőztető csővel, és egy kivezető nyílással ellátva;

b) mágneses keverők, a rosszul oldódó kémiai anyagok kiértékelésekor;

c) gázabszorpciós üvegek;

d) a légáram szabályozására és mérésére szolgáló készülék;

e) szén-dioxid kivonására alkalmas berendezés a szén-dioxid-mentes levegő elkészítéséhez; más lehetőségként gázpalackokból származó CO_2-mentes oxigén és CO_2-mentes nitrogén keveréke használható a megfelelő arányokban (20 % O_2: 80 % N_2);

f) készülék a szén-dioxid meghatározására, vagy titrimetriás méréshez vagy szervetlenszén-analízishez;

g) membránszűrő készülék (választható);

h) DOC-analizátor.

IV.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A törzsoldatok elkészítését lásd az I.6.2. pontban.

10 ml (a) oldatot 800 ml hígítóvízzel kell összekeverni, 1 ml (b)–(d) oldatot kell hozzáadni, majd 1 literre hígítóvízzel kiegészíteni.

IV.2.3. **Inokulum előkészítése és előkondicionálása**

Az inokulum különböző forrásokból szerezhető be: lehet elevenisza; kezelt szennyvíz; felszíni víz; talaj vagy ezek vegyesen.

Lásd az I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. és I.6.5. pontot.

IV.2.4. **A lombikok előkészítése**

A következő térfogatok és tömegek jelzik a 3 liter szuszpenziót tartalmazó 5 literes lombikokhoz tartozó értékeket. Ennél kisebb térfogatú lombikok használatakor megfelelően módosítani kell az értékeket, de gondoskodni kell arról, hogy pontosan mérhető legyen a fejlődött szén-dioxid.

Minden egyes 5 literes lombikba önteni kell 2 400 ml ásványianyag-tápoldatot. Hozzá kell adni megfelelő mennyiségű előkészített eleveniszapot (lásd az I.6.4.1. és I.6.5. pontot) úgy, hogy a végleges 3 literes beoltott keverékben 30 mg/l-nél nem nagyobb szuszpendált szilárdanyag-koncentrációt kapjanak. Más megoldás: először hígítani kell az előkészített iszapot úgy, hogy 500–1 000 mg/l szuszpenziót kapjanak az ásványianyag-tápoldatban, mielőtt hozzáadnánk egy aliquot részt az 5 literes lombik tartalmához a 30 mg/l-es koncentráció elérésére; ez utóbbi eljárás nagyobb pontosságot biztosít. Használhatók más inokulumforrások is (lásd az 1.6.4.2. pontot).

A szén-dioxidnak a rendszerből történő eltávolítása érdekében a beoltott keverékeket CO_2-mentes levegővel kell levegőztetni egy éjszakán át.

▼B

Az ismételt vizsgálatokhoz alkalmazandó lombikokhoz a vizsgált anyagot és a referenciaanyagot külön-külön kell hozzáadni, ismert töménységű törzsoldatok formájában, úgy, hogy a hozzáadott anyagokkal együtt 10–20 mg DOC vagy TOC/l-koncentrációkat kapjanak; néhány lombikhoz nem adnak hozzá kémiai anyagot, hanem meghagyják azokat inokulumkontrollnak. A rosszul oldódó vizsgált anyagokat közvetlenül kell a lombikokba bevinni tömeg vagy térfogat alapján, vagy azokat a 3. függelékben ismertetett módon kell kezelni.

Ha szükséges, használható egy lombik a vizsgált kémiai anyag esetleges gátló hatásának ellenőrzésére, e lombikba mind a vizsgált, mind a referenciaanyagokat ugyanolyan koncentrációkban kell bevinni, mint ahogy azok a többi lombikban jelen vannak.

Ezenkívül, ha szükséges, egy steril lombik használható annak ellenőrzésére, hogy lebomlik-e abiotikusan a vizsgált kémiai anyag; ehhez az anyag nem beoltott oldatát kell használni (lásd az I.6.6 pontot). A sterilizáció megfelelő koncentrációjú toxikus anyag hozzáadásával történik.

Mindhárom lombikban ki kell egészíteni a szuszpenzió térfogatát 3 literre előzőleg CO_2-mentes levegővel levegőztetett ásványianyag-tápoldat hozzáadásával. Tetszés szerint minták vehetők DOC-analízishez (lásd a 2. függelék 4. pontját) és/vagy a specifikus analízishez. Az abszorpciós üvegeket a lombikok levegőkivezető nyílásához kell csatlakoztatni.

Ha bárium-hidroxidot használnak, három abszorpciós üveget kell sorba csatlakoztatni, amelyek közül mindegyik 100 ml 0,0125 M bárium-hidroxid-oldatot tartalmaz, minden egyes 5 literes lombikhoz. Az oldatnak kicsapódott szulfáttól és karbonáttól mentesnek kell lennie, és közvetlenül a használat előtt meg kell határozni a koncentrációját. Ha nátrium-hidroxidot használnak, csatlakoztatni kell két abszorpciós csapdát, amelyek közül a második ellenőrzésre szolgál annak bemutatására, hogy minden szén-dioxid abszorbeálásra került az elsőben. A szérumos üvegekéhez hasonló záróelemmel ellátott üvegek alkalmasak e célra. Mindkét üvegbe 200 ml 0,05 M nátrium-hidroxidot kell bevinni, amely elegendő a vizsgált anyag teljes lebomlásakor fejlődő teljes szén-dioxid mennyiségének abszorbeálására. A nátrium-hidroxid-oldat, még ha frissen elkészített is, nyomokban tartalmazni fog karbonátokat; ezt a vakpróbában lévő karbonátmennyiség levonásával korrigálni kell.

IV.2.5. **A lombikok száma egy tipikus vizsgálatsorozatban**

1. és 2. lombik: vizsgált szuszpenzió

3. és 4. lombik: inokulum-vakpróba

5. lombik: eljáráskontroll

Ajánlott és amikor szükséges:

6. lombik: abiotikus steril kontroll

7. lombik: toxicitáskontroll

Lásd még az I.6.7. pontot is.

IV.2.6. **A kísérlet végrehajtása**

A kísérlet kezdetén CO_2-mentes levegőt kell belevezetni a szuszpenziót tartalmazó tartályokba 30–100 ml/perc átfolyási sebesség mellett. Szabályos időközönként mintákat kell venni a szén-dioxid-abszorbensből a CO_2-tartalom elemzésére. Az első 10 nap során ajánlatos az elemzéseket minden második vagy harmadik napon elvégezni, és ezután minden 5. napon a 28. napig azért, hogy meghatározható legyen a „tíznapos ablak”.

▼B

A 28. napon mintákat kell venni (tetszés szerint) a DOC- és/vagy a specifikus analízis céljából, meg kell mérni a szuszpenzió pH-ját, és bele kell tenni 1 ml tömény sósavat minden egyes lombikba; a lombikokat egész éjszakán át a vizsgált szuszpenziókban jelen lévő szén-dioxid eltávolítása érdekében szellőztetni kell. A 29. napon kell végrehajtani a fejlődött szén-dioxid utolsó elemzését.

A CO_2-mérések napjain el kell választani a lombikhoz legközelebbi bárium-hidroxid abszorbciós üveget, és titrálni kell a hidroxid-oldatot 0,05 M HCl-dal, indikátorként fenolftaleint használva. A többi abszorbciós üveget eggyel közelebb kell tenni a lombikhoz, és el kell helyezni egy új, 100 ml friss 0,0125 M bárium-hidroxidot tartalmazó abszorbciós üveget a sor legtávolabbi végére. Titrálást kell végezni szükség szerint, például amikor jelentős csapadékképződés látható az első abszorpciós üvegben, és mielőtt ennek bármilyen bizonyítéka lenne látható a második üvegen, vagy legalább hetente. Más megoldásként, abszorbensként NaOH-t használva, fecskendővel kis térfogatú nátrium-hidroxid-oldat-mintát kell venni (az elemzéshez használt szénanalizátor jellemzőitől függően) a lombikhoz legközelebbi abszorbciós üvegből. A mintát be kell fecskendezni a szénelemző készülék IC-részébe a fejlődött szén-dioxid közvetlen elemzéséhez.

A második abszorpciós csapda tartalmát csak a vizsgálat végén kell elemezni az összes szén-dioxid-átvitel figyelemb evételével.

IV.3. ADATOK ÉS JELENTÉS

IV.3.1. **Eredmények kiértékelése**

A titráláskor az abszorberben megkötődött CO_2-mennyiséget a következő összefüggés adja meg:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

ahol:

V = az abszorberben a 100 ml titrálásához használt HCl térfogata (ml),

C_B = bárium-hidroxid-oldat koncentrációja (M),

C_A = a sósavoldat koncentrációja (M),

ha a C_B értéke 0,0125 M és a C_A értéke 0,05 M, 100 ml bárium-hidroxid esetében a titráláshoz felhasznált térfogat 50 ml, és a CO_2 tömegét a következő összefüggés adja meg:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{titráláshoz használt HCl} = 1{,}1 \times \text{ml HCI}$$

Így tehát ebben az esetben a titrált HCl-térfogatnak megfelelően a fejlődött CO_2 mennyisége (mg) közötti szorzótényező 1,1.

Ki kell számítani az egyedül az inokulumból és az inokulumból plusz a vizsgált anyagból fejlődött CO_2 tömegét a megfelelő titrálási értékek segítségével, ezek különbsége a kizárólag a vizsgált anyagból fejlődött CO_2 mennyisége.

Például, ha kizárólag az inokulum esetében 48 ml kell a titráláshoz és az inokulum plusz vizsgált anyaghoz együttesen 45 ml, akkor

a CO_2 inokulum esetében = 1,1 x (50 – 48) = 2,2 mg

▼B

a CO_2 inokulum plusz vizsgált anyag esetében = 1,1 x (50 – 45) = 5,5 mg

tehát a vizsgált anyagból fejlődött CO_2 mennyisége 3,3 mg.

A százalékos biológiai lebomlás a következő összefüggésből számító ki:

$$\% \text{ lebomlás} = \frac{\text{fejlődött mg } CO_2 \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg hozzáadott vizsgált anyag}}$$

vagy

$$\% \text{ lebomlás} = \frac{\text{fejlődött mg } CO_2 \times 100}{\text{vizsgálatban hozzáadott mg TOC} \times 3{,}67}$$

az átváltási arány 3,67 (44/12) a szén és a szén-dioxid között.

Ki kell számítani a százalékos lebomlást minden egyes időintervallum után a mérés végrehajtásának időpontjáig az egyes napokhoz kiszámított $ThCO_2$ értékek százalékának összeadásával.

Nátrium-hidroxid abszorberek esetében ki kell számítani a fejlődött szén-dioxid-mennyiséget, IC-ben (szervetlen szén) (mg) kifejezve, megszorozva az IC koncentrációját az abszorbensben az abszorbens térfogatával.

A százalékos lebomlást a következő összefüggésből lehet kiszámítani:

$$\% ThCO_2 = \frac{\text{mg IC a vizsgált anyagot tartalmazó lombikból} - \text{mg IC a vakpróbából}}{\text{vizsgált anyagként hozzáadott TOC}} \times 100$$

A DOC csökkenését (választható) az I.7. pontban leírtaknak megfelelően lehet kiszámítani. Ezt és minden más eredményt a megadott adatlapokra kell feljegyezni.

IV.3.2. **Eredmények érvényessége**

A vizsgálat kezdetén az ásványianyag-tápoldatban lévő vizsgált anyag szuszpenzió IC-tartalmának a TC 5 %-ánál kevesebbnek kell lennie, és a vizsgálat végén az inokulum-vakpróbában a teljes CO_2-fejlődésnek általában nem szabad 40 mg/l oldószernél nagyobbnak lennie. Ha 70 mg CO_2/l-nél nagyobb értékeket kapnak, alaposan meg kell vizsgálni az adatokat és a kísérleti módszert.

Lásd még az I.5.2. pontot is.

IV.3.3. **Vizsgálati jelentés**

Lásd az I.8. pontot.

IV.4. ADATLAP

Példa az adatlapra.

SZÉN-DIOXID-FEJLŐDÉS-VIZSGÁLAT

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat-koncentráció: … mg/l, az anyagra vonatkoztatva

▼B

Kezdeti koncentráció a médiumban: … mg/l az anyagra vonatkoztatva

A lombik tartalmához hozzáadott szén teljes mennyisége: … mg C

$ThCO_2$: … mg CO_2

4. **INOKULUM**

Forrás:

Végrehajtott kezelés:

Előkondicionálás, ha van ilyen:

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja a reakciókeverékben: … mg/l

5. **SZÉN-DIOXID-FEJLŐDÉS ÉS -LEBONTHATÓSÁG**

Idő (nap)	A vizsgálatban képződött CO_2 (mg)		A vakpróbában képződött CO_2 (mg)		Képződött CO_2 összesen (mg), a vizsgált anyag és a vakpróba különbségeinek átlaga		$\frac{\text{összes } CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	átlag	3 / 4	átlag	1	2	1	2	átlag
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Megjegyzés: hasonló adatlapok használhatók a referenciaanyagokhoz és a toxicitáskontrollokhoz is.

6. **SZÉNANALÍZIS** (választható)

Szénanalizátor:

Idő (nap)	Vakpróba mg/liter	Vizsgált anyag mg/liter
0	(C_{bo})	(C_o)
28 (*)	(C_{bt})	(C_t)

(*) vagy az inkubációs periódus végén.

▼B

$$\% \text{ DOC csökkenés} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTIKUS LEBOMLÁS** (választható)

$$\% \text{ abiotikus bomlás} = \frac{CO_2 \text{ fejlődés steril kontrollban 28 nap után [mg]}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

V. RÉSZ **MANOMETRIKUS RESPIROMETRIÁS MÉRÉS** (C.4-D. Módszer)

V.1. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Kizárólagos szerves szénforrásként a vizsgált anyag ismert koncentrációját (100 mg/l vizsgált anyag, legalább 50–100 mg ThOD/liter létrehozásához) tartalmazó, mért térfogatú, beoltott ásványianyag-tápoldatot kell keverni zárt lombikban, állandó hőmérsékleten (± 1 °C vagy ennél kisebb eltérés mellett) legfeljebb 28 napig. Meg kell határozni az oxigénfogyasztást vagy a respirométer-palackban az állandó gáztérfogat fenntartásához szükséges (elektrolízis útján előállított) oxigénmennyiség mérésével, vagy a készülékbeli térfogat- vagy nyomásváltozás (vagy a kettő valamilyen kombinációjának) vizsgálatával. A fejlődött szén-dioxidot kálium-hidroxid-oldatban vagy valamilyen más alkalmas abszorbensben nyeletik el. A vizsgált anyag által felvett oxigén (az egyidejűleg vizsgált vakpróba-inokulum által felvett mennyiség figyelembevételével helyesbítve) mennyiségét a ThOD vagy a COD százalékaként kell kifejezni. Tetszés szerint az elsődleges biológiai lebomlás is kiszámítható az inkubációs periódus kezdetén és végén végrehajtott kiegészítő specifikus elemzésből, és elvégezhető a végső biológiai lebomlás DOC-analízise.

V.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

V.2.1. **Készülék**

a) alkalmas respirométer;

b) termosztát, amely ± 1 °C vagy ennél nagyobb pontossággal képes a hőmérséklet fenntartására;

c) membránszűrő készülék (választható);

d) szénanalizátor (választható).

V.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A törzsoldatok elkészítését lásd az I.6.2. pontban.

10 ml (a) oldatot 800 ml hígítóvízzel kell összekeverni, 1 ml (b)–(d) oldatot kell hozzáadni, majd 1 literre hígítóvízzel kiegészíteni.

V.2.3. **Inokulum előkészítése és előkondicionálása**

Az inokulum különböző forrásokból szerezhető be: lehet elevenisszap; kezelt szennyvíz; felszíni víz; talaj vagy ezek vegyesen.

Lásd az I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. és I.6.5. pontot.

V.2.4. **A lombikok előkészítése**

A vizsgált és referenciaanyagból külön lombikokban oldatokat készítenek ásványianyagtápoldatban, a törzsoldatok felhasználásával úgy, hogy az oldatok koncentrációja általában 100 mg anyag/liter legyen, ami legalább 50–100 mg ThOD/liter-értéknek felel meg.

▼B

Ki kell számítani a ThOD-t az ammóniumsók képződése alapján, kivéve ha nitrifikáció várható, ebben az esetben a számításnak a nitrátképződésen (lásd a 2. függelék 2. pontját) kell alapulnia.

A pH-értékeket meg kell határozni, és ha szükséges, be kell állítani azokat 7,4 ± 0,2-re.

A rosszul oldódó anyagok hozzáadására későbbi fázisban kerül sor (lásd alább).

Ha meg kell határozni a vizsgált anyag toxicitását, akkor egy másik oldatot kell elkészíteni ásványianyag-tápoldatban, amely ugyanolyan koncentrációkban tartalmazza mind a vizsgált, mind a referenciaanyagokat, mint az egyes oldatok.

Ha mérni kell a fizikai-kémiai okokra visszavezethető oxigénfelvételt, akkor el kell készíteni általában egy 100 mg ThOD/liter koncentrációjú oldatot, amelyet megfelelő toxikus anyag hozzáadásával sterilizálnak (lásd az I.6.6. pontot).

A szükséges térfogatú vizsgált, illetve referenciaoldatokat legalább két lombikba kell szétosztani. Ezenkívül további lombikokba csak ásványianyag-tápoldatot kell tenni (inokulum kontrollvizsgálathoz), illetve, ha szükséges, az összekevert vizsgált/referenciaoldatot és a steril oldatot.

Ha a vizsgált anyag rosszul oldódik, akkor azt közvetlenül e szakaszban tömeg vagy térfogat alapon kell az edénybe bevinni, vagy a 3. függelékben leírt módon kell azt kezelni. Káliumhidroxidot, nátronmész-pasztillákat vagy más abszorbenseket kell adagolni a CO_2-abszorbciós üvegekbe.

V.2.5. **A lombikok száma egy tipikus vizsgálatsorozatban**

1. és 2. lombik: vizsgált szuszpenzió

3. és 4. lombik: inokulum-vakpróba

5. lombik: eljáráskontroll

Ajánlott és amikor szükséges:

6. lombik: abiotikus steril kontroll

7. lombik: toxicitáskontroll

Lásd még az 1.6.7. pontot is.

V.2.6. **A kísérlet végrehajtása**

Miután a lombikok elérték a kívánt hőmérsékletet, azokat be kell oltani a megfelelő előkészített eleveniszappal vagy más inokulumforrással úgy, hogy a kapott szuszpendált szilárd anyag koncentrációja ne legyen 30 mg/l-nél nagyobb. Össze kell szerelni a berendezést, elindítani a keverőt, és ellenőrizni a légmentes záródást, majd meg kell kezdeni az oxigénfelvétel mérését. Rendszerint semmilyen további figyelemre nincs szükség, a mért érték leolvasásán és azokon a napi ellenőrzéseken kívül, amelyek során meg kell mérni, hogy fennmaradt-e a megfelelő hőmérséklet és a megfelelő keverés.

Az oxigénfelvételt a rendszeres és gyakori időközönként leolvasott értékekből lehet kiszámítani a berendezés gyártója által megadott módszerek segítségével. Az inkubálás végén, általában a 28. napon, meg kell mérni a lombikok tartalmának pH-ját, különösen akkor, ha alacsony vagy (nitrogéntartalmú vegyületek esetében) meghaladja a $ThODNH_4$ értékét.

▼B

Ha szükséges, a respirométer-palackokból a mérés elején és végén, a DOC- vagy a specifikus kémiai elemzés végrehajtására mintát kell venni (lásd a 2. függelék 4. pontját). A mérés kezdetén végrehajtott mintavételkor gondoskodni kell arról, hogy ismert legyen a palackban maradó vizsgált szuszpenzió térfogata. Amikor a nitrogént tartalmazó vizsgált anyag oxigént vesz fel, meg kell határozni a nitrit és a nitrát koncentrációjának növekedését a 28 nap alatt, a nitrifikáció következtében elfogyasztott oxigén figyelembevételével (5. függelék).

V.3. ADATOK ÉS VIZSGÁLATI JELENTÉS

V.3.1. **Az eredmények kiértékelése**

El kell osztani valamely adott időt követően (az ugyanennyi idő után a vakpróbainokulum-kontroll által felvett oxigén figyelembevételével helyesbített) a vizsgált kémiai anyagra vonatkozó oxigénfelvételt (mg) a felhasznált vizsgált anyag tömegével. Ezzel megkapják a mg oxigén/mg vizsgált anyag hányadosaként kifejezett BOD-t, vagyis

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ uptake by test chemical} - \text{mg } O_2 \text{ uptake by blank})}{(\text{vizsgált anyag lombikban [mg]})}$$

O_2 [mg]) / (vizsgált anyag lombikban [mg])

A százalékos biológiai lebomlás kiszámítható a következő összefüggések valamelyikéből:

$$\%\ \text{biológiai lebomlás} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg anyag})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2 \text{ anyag})} \times 100$$

vagy:

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg anyag})}{\text{COD}(\text{mg } O_2 \text{ anyag})} \times 100$$

Meg kell jegyezni, hogy e két módszer nem ad szükségképpen azonos értéket; az első módszer használatát kell előnyben részesíteni.

Nitrogéntartalmú vizsgált anyagokhoz a megfelelő ThOD-t kell használni (NH_4 vagy NO_3) annak megfelelően, hogy várható-e nitrifikáció, vagy sem (lásd a 2. függelék 2. pontját). Ha előfordul nitrifikáció, de az nem teljes, ki kell számítani egy, a nitrifikálással elfogyasztott oxigént figyelembe vevő korrekciós tényezőt a nitrit és nitrát koncentrációjában létrejövő változásokból (5. függelék).

Amikor a szerves szén és/vagy a specifikus kémiai analízis mellett döntenek, ki kell számítani a százalékos lebomlást az I.7. pontban leírt módon.

Minden eredményt fel kell jegyezni a mellékelt adatlapokra.

V.3.2. **Az eredmények érvényessége**

Az inokulum-vakpróba oxigénfelvétele általában 20–30 mg O_2/liter, és nem szabad, hogy 60 mg/liternél nagyobb legyen 28 nap alatt. 60 mg/liternél nagyobb értékek esetében alaposan meg kell vizsgálni az adatokat és a kísérleti módszereket. Ha a pH-érték kívül van a 6–8,5-ös tartományon, és a vizsgált anyag által felvett oxigén kevesebb mint 60 %, akkor a vizsgálatot meg kell ismételni a vizsgált anyag kisebb koncentrációjával.

Lásd még az I.5.2. pontot is.

▼B

V.3.3. **Vizsgálati jelentés**

Lásd az I.8. pontot.

V.4. **ADATLAP**

Példa az adatlapra.

MANOMETRIKUS RESPIROMETRIÁS VIZSGÁLAT

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat-koncentráció: … mg/liter

Kezdeti koncentráció a médiumban, C_o: … mg/liter

Térfogat a vizsgálólombikban (V): … ml

ThOD vagy COD: … mg O_2/mg vizsgált anyag (NH_4, NO_3)

4. **INOKULUM**

Forrás:

Végrehajtott kezelés:

Előkondicionálás, ha van ilyen:

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja a reakciókeverékben: … mg/l

5. **OXIGÉNFELVÉTEL: BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG**

		Idő (nap)											
		0		7		14			21			28	
O_2-felvétel (mg), vizsgált anyag	1												
	2												
	a, átlag												
O_2-felvétel (mg) vakpróba	3												
	4												
	b, átlag												
Korrigált BOD (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD/mg vizsgált anyag	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Idő (nap)											
		0		7		14			21			28	
% lebomlás $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Átlag (*)												

V = közeg térfogata a vizsgálati lombikban.
(*) A D_1-et és D_2-t nem szabad átlagolni, ha jelentős a különbség a kettő között.

Megjegyzés: hasonló adatlapok használhatók a referenciaanyagokhoz és a toxicitáskontrollokhoz is.

6. **KORREKCIÓ A NITRIFIKÁCIÓ FIGYELEMBEVÉTELÉVEL** (lásd az 5. függeléket)

Nap		0	28	Különbség
i.	Nitrátkoncentráció (mg N/liter)			(N)
ii.	Oxigén-egyenértékben kifejezve (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii.	Nitritkoncentráció (mg N/liter)			(N)
iv.	Oxigén-egyenértékben kifejezve (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
ii + iv.	Teljes oxigén-egyenérték	—	—	

7. **SZÉNANALÍZIS** (választható)

Szénanalizátor:

Idő (nap)	Vakpróba mg/liter	Vizsgált anyag mg/liter
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) vagy az inkubációs periódus végén.

$$\%\ \text{DOC} - \text{csökkenés} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPECIFIKUS ANALÍZIS** (választható)

S_b = a vizsgált anyag koncentrációja fizikai-kémiai (steril) kontrollban a 28. napon

S_a = koncentráció a beoltott lombikban a 28. napon

$$\%\ \text{biológiai lebomlás} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTIKUS LEBOMLÁS** (választható)

a = oxigénfelvétel a steril lombikokban 28 nap után, (mg)

$$\text{oxigénfelvétel mg vizsgált anyagonként} = \frac{a \times 100}{C_o V}$$

▼B

(lásd az 1. és 3. szakaszt)

$$\% \text{ abiotikus lebomlás} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

VI. RÉSZ. **ZÁRTPALACK-MÓDSZER** (C.4-E. Módszer)

VI.1. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált kémiai anyagnak ásványianyag-tápoldatban lévő, rendszerint 2–5 mg/liter koncentrációjú oldatát be kell oltani viszonylag kis számú, vegyes populációból származó mikroorganizmussal, és teljesen teletöltött, zárt palackokban, sötétben, állandó hőmérsékleten kell tartani. A lebomlást a 28 napos időtartam alatt a feloldódott oxigén analízise követi. A vizsgált anyag által felvett oxigénmennyiséget, az egyidejűleg végrehajtott vizsgálatban a vakpróba-inokulum által felvett oxigén figyelembevételével helyesbítve, a ThOD vagy a COD százalékában kell kifejezni.

VI.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

VI.2.1. **Készülék**

a) BOD-palackok, üvegdugókkal, például 250–300 ml-esek;

b) Vízfürdő vagy inkubátor, amelyekben a palackok állandó hőmérsékleten (± 1 °C vagy ennél nagyobb pontosság mellett) sötétben tarthatók;

c) Nagyméretű üvegpalackok (2–5 literesek) a közeg előkészítésére és a BOD-palackok megtöltésére;

d) Oldottoxigén-mérő, valamint reagensek a Winkler-féle titráláshoz.

VI.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A törzsoldatok elkészítését lásd az I.6.2. pontban.

Össze kell keverni 1 ml-t az (a)–(d) oldatokból, és azt hígítóvízzel ki kell egészíteni 1 literre.

VI.2.3. **Az inokulum előkészítése**

Az inokulum valamilyen, döntően háztartási szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telep vagy egység másodlagos kezelt szennyvízéből származik. Alternatív inokulumforrás a felszíni víz. Általában egy csepp (0,05 ml) és 5 ml közötti szűrletet kell használni ásványianyagtápoldat-literenként; kísérletezésre lehet szükség adott inokulumforrás vonatkozásában az optimális térfogat kiderítésére (lásd az I.6.4.2. és I.6.5. pontot).

VI.2.4. **A lombikok előkészítése**

Az ásványianyag-tápoldatot legalább 20 percig kell intenzíven levegőztetni. Ugyanazon adagból származó ásványianyag-tápoldattal kell végrehajtani minden egyes vizsgálatsorozatot. Az oldószer általában a vizsgálati hőmérsékleten való 20 óra állást követően kész a felhasználásra. Az oldott oxigén koncentrációját ellenőrzési célból kell meghatározni; az értéknek körülbelül 9 mg/liternek kell lennie 20 °C-os hőmérsékleten. A levegővel telített közeg minden áthelyezési és áttöltési műveletét buborékmentesen kell végrehajtani, például szívócsövek segítségével.

▼B

A BOD-palackok csoportjait kell elkészíteni a vizsgált és a referenciaanyagok meghatározására végzett egyidejű kísérletsorozatokhoz. Elegendő számú BOD-palacknak kell rendelkezésre állnia, az inokulum-vakpróbákat is ideértve úgy, hogy legalább két oxigénfogyasztás-mérés legyen végrehajtható a kívánt időintervallumokban, például a 0., 7., 14., 21. és 28. nap után. Lehet, hogy további palackokra lesz szükség annak biztosítására, hogy azonosítható legyen a „tíznapos ablak”.

A teljesen kilevegőztetett ásványianyag-tápoldatot a nagy palackokba úgy kell beletölteni, hogy azok körülbelül 1/3 részükig legyenek megtöltve. Ezután a nagy palackokba bele kell tölteni a vizsgált anyag és a referenciaanyag törzsoldatából elegendő mennyiséget úgy, hogy az anyagok végleges koncentrációja általában ne legyen 10 mg/liternél nagyobb. Semmilyen kémiai anyagot nem lehet beleönteni a vakpróba kontrolloldószert tartalmazó nagy palackba.

Annak biztosítására, hogy az inokulumaktivitás ne legyen korlátozott, az oldott oxigén koncentrációjának nem szabad 0,5 mg/liter alá csökkennie a BOD-palackokban. Ez körülbelül 2 mg/literre korlátozza a vizsgált anyag koncentrációját. Azonban a nehezen lebomló vegyületekhez és az alacsony ThOD-értékű vegyületekhez 5–10 mg/liter használható. Néhány esetben ajánlatos lehet a vizsgált anyagot egyidejűleg vizsgálni két különböző, például 2 és 5 mg/literes koncentráció mellett. Általában a ThOD-t az ammóniumsók képződése alapján kell kiszámítani, de ha nitrifikáció várható, vagy ismert, hogy ez előfordul, a számításnak a nitrátképződésen kell alapulnia ($ThOD_{NO3}$: lásd a 2. függelék 2. pontját). Azonban, ha előfordul ugyan nitrifikáció, de ez nem teljes, korrekciót kell végrehajtani a nitrit és a nitrát koncentrációjában az elemzés által meghatározott változások figyelembevételével (lásd az 5. függeléket).

Ha meg kell vizsgálni a vizsgált anyag toxicitását (például abban az esetben, ha előzőleg kis mértékű biológiai lebonthatóság volt tapasztalható), akkor egy másik palacksorozat szükséges.

Egy másik nagy palackra is szükség van a kilevegőztetett, kb. harmadáig megtöltött ásványianyag-tápoldat befogadására, valamint a vizsgált anyag és a referenciaanyag bevitelére olyan végleges koncentrációban, amely általában megegyezik a többi nagy palackban lévő koncentrációval.

A nagy palackokban lévő oldatokat másodlagos kifolyó szennyvízzel (egy cseppel vagy körülbelül 0,05 ml-től 5 ml/l-ig terjedő mennyiséggel), vagy valamilyen más forrásból származó inokulummal, például folyóból vett vízzel (lásd az I.6.4.2. pontot) kell beoltani. Végül az oldatokat kilevegőztetett ásványianyag-tápoldattal kell kiegészíteni úgy, hogy kitöltsék a teljes térfogatot, az oldószer beviteléhez a palack aljáig leérő csövet kell használni, azért hogy megfelelő keveredést érjenek el.

VI.2.5. **A palackok száma egy tipikus vizsgálatsorozatban**

Egy tipikus vizsgálatsorozatban a következő palackokra van szükség:

— a vizsgált anyagot és az inokulumot (vizsgált szuszpenzió) tartalmazó legalább 10 palack,

— csak inokulumot (inokulum-vakpróba) tartalmazó legalább 10 palack,

— referenciaanyagot és inokulumot (eljáráskontroll) tartalmazó legalább 10 palack,

▼B

— és amikor szükséges, a vizsgált anyagot, referenciaanyagot és inokulumot (toxicitáskontroll) tartalmazó 6 palack. Annak biztosítására, hogy meghatározható legyen a „tíznapos ablak”, körülbelül kétszer ennyi palackra lehet szükség.

VI.2.6. A kísérlet végrehajtása

Minden egyes előkészített oldatot a megfelelő nagy palack alsó negyedéből kell kiadagolni (nem az aljából) egy cső segítségével a BOD-palackok megfelelő csoportjába úgy, hogy minden BOD-palack teljesen tele legyen. A palackokat ezután óvatosan meg kell ütögetni az esetleges légbuborékok eltávolítása céljából. A palackokat a nulla időpontban azonnal elemezni kell az oldott oxigén mennyiségének megállapítása céljából a Winkler- vagy az elektróda módszer segítségével. A palackok tartalma tartósítható a Winkler-módszerrel végrehajtott későbbi elemzéshez mangán(II)-szulfát és nátrium-hidroxid (első Winkler-reagens) hozzáadásával. A gondosan ledugózott palackokat, amelyek az oxigént barna mangán(III)-hidroxidként kötve tartalmazzák, sötétben, 10–20 °C hőmérsékleten, 24 óránál nem hosszabb ideig kell tárolni, mielőtt végrehajtanánk a Winkler-módszer hátralévő lépéseit. A többi, másodpéldányként szolgáló palackot is le kell fedni dugóval, gondoskodva arról, hogy ne legyen bennük légbuborék, e palackokat 20 °C hőmérsékleten, sötét helyen kell inkubálni. Minden egyes vizsgálatsorozatot egy teljes párhuzamos sorozatnak kell kísérnie az inokulumvakpróba-értékek meghatározására. A 28 napos inkubálási idő során bizonyos időközönként (legalább hetente) minden sorozatból legalább két palackot el kell távolítani az oldott oxigén mennyiségének meghatározása érdekében.

A hetenként vett mintáknak lehetővé kell tenniük valamely 14 napos időintervallum során a százalékos csökkenés kiértékelését, míg a 3–4 naponként történő mintavételnek lehetővé kell tennie a „tíznapos ablak” meghatározását, amelyhez körülbelül kétszer annyi palackra van szükség.

Nitrogéntartalmú anyagok vizsgálata esetében korrekciót kell végrehajtani a nitrifikáció következtében végbemenő oxigénfelvétel tekintetében. Ennek végrehajtására az O_2-elektróda módszert kell használni az oldott oxigén koncentrációjának meghatározására, ezután mintát kell venni a BOD-palackból a nitrit és a nitrát elemzésére. A nitrit és a nitrát koncentrációjának növekedéséből lehet kiszámítani a felhasznált oxigén mennyiségét (lásd az 5. függeléket).

VI.3. ADATOK ÉS JELENTÉS

VI.3.1. **Eredmények kiértékelése**

Először ki kell számítani az egyes időtartamok utáni BOD-t a vizsgált anyag oxigénfelvételéből kivonva az inokulum-vakpróba oxigénfelvételét (mg O_2/liter). A korrigált oxigénfelvétel értékét el kell osztani a vizsgált anyag koncentrációjával (mg/liter), hogy megkapják az adott BOD-t mg oxigén/mg vizsgált anyagként. Ki kell számítani a százalékos biológiai lebonthatóságot az adott BOD-nek az adott ThOD-val (a 2. függelék 2. pontjának megfelelően kiszámított) vagy COD-val (elemzéssel meghatározva, lásd a 2. függelék 3. pontját) való elosztásával, azaz:

$$\text{BOD} = \frac{\text{a vizsgált anyag által felvett } O_2 \text{ [mg]} - \text{a vakpróba által felvett } O_2 \text{ [mg]}}{\text{a palackban lévő vizsgált anyag [mg]}}$$

▼B

= mg O_2/mg vizsgált anyag

$$\% \text{ lebomlás} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg vizsgált anyag)}}{\text{ThOD(mg } O_2/\text{mg vizsgált anyag)}} \times 100$$

vagy:

$$\% \text{ lebomlás} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg vizsgált anyag)}}{\text{COD(mg } O_2/\text{mg vizsgált anyag)}} \times 100$$

Meg kell jegyezni, hogy e két módszer nem ad szükségképpen azonos értéket; az első módszer használatát kell előnyben részesíteni.

Nitrogéntartalmú anyagok vizsgálatához a megfelelő ThOD-t kell használni (NH_4 vagy NO_3) annak megfelelően, hogy várható-e nitrifikáció, vagy sem. Ha előfordul nitrifikáció, de az nem teljes, ki kell számítani egy, a nitrifikálással elfogyasztott oxigént figyelembe vevő korrekciós tényezőt a nitrit és nitrát koncentrációjában létrejövő változásokból (5. függelék).

VI.3.2. **Az eredmények érvényessége**

Az inokulum-vakpróbában az oxigéncsökkenésnek nem szabad 1,5 mg oldott oxigén/liternél nagyobbnak lennie 28 nap eltelte után. Ennél nagyobb értékek esetén meg kell vizsgálni a kísérleti módszereket. A vizsgált palackokban a maradék oxigén koncentrációjának soha nem szabad 0,5 mg/liter alá csökkennie. Az ilyen alacsony oxigénszintek csak akkor érvényesek, ha az oldott oxigén meghatározására használt módszer képes pontosan mérni az ilyen alacsony szinteket.

Lásd még az I.5.2. pontot is.

VI.3.3. **Vizsgálati jelentés**

Lásd az I.8. pontot.

VI.4. ADATLAP

Példa az adatlapra.

ZÁRT PALACKOS VIZSGÁLAT

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat-koncentráció: … mg/liter

Kezdeti koncentráció a palackban: … mg/liter

ThOD vagy COD: … mg O_2/mg vizsgált anyag

4. **INOKULUM**

Forrás:

Végrehajtott kezelés:

▼B

Előkondicionálás, ha van ilyen:

Koncentráció a reakciókeverékben: … mg/liter

5. **OLDOTT OXIGÉN (DO) MEGHATÁROZÁSA**

Módszer: Winkler-módszer/oldott oxigén mérése elektródával

Meghatározások a palackokból

Inkubálás időtartama (nap)			Oldott oxigén (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Vakpróba (vizsgált anyag nélkül	1	C_1				
	2	C_2				
Átlag	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Vizsgált anyag	1	a_1				
	2	a_2				
Átlag	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Megjegyzés: hasonló adatlapok használhatók a referenciaanyagokhoz és a toxicitáskontrollokhoz is.

6. **KORREKCIÓ A NITRIFIKÁCIÓ FIGYELEMBEVÉTELÉVEL** (lásd az 5. függeléket)

Inkubálás időtartama (nap)		0	n_1	n_2	n_3
i.	Nitrátkoncentráció (mg N/liter)				
ii.	Nitrátkoncentráció változása (mg N/liter)	—			
iii.	Oxigén-egyenértékben kifejezve (mg/liter)	—			
iv.	Nitritkoncentráció (mg N/liter)				
v.	Nitritkoncentráció változása (mg N/liter)	—			
vi.	Oxigén-egyenértékben kifejezve (mg/liter)	—			
iii.	+ vi. Teljes oxigén-egyenérték (mg/liter)	—			

7. **OLDOTTOXIGÉN-CSÖKKENÉS: % LEBOMLÁS**

	Csökkenés n nap után (mg/liter)			
	n_1	n_2	n_3	
1. PALACK: $(m_{to} - mt_x) - (m_{bo} - m_{bx})$				
2. PALACK: $(m_{to} - mt_x) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Csökkenés n nap után (mg/liter)			
	n_1	n_2	n_3	
1. PALACK $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{vizsgálat anyag koncentrációja} \times \text{ThOD kémiai anyag}}$				
2. PALACK $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{vizsgálat anyag koncentrációja} \times \text{ThOD kémiai anyag}}$				
$\%\ D\ \text{átlag}\ (*) = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Nem adagolható, ha jelentős különbség van az ismételt mérések között.

m_{to} = a vizsgálati palackban a 0 időpontban mért érték

m_{tx} = a vizsgálati palackban az x időpontban mért érték

m_{bo} = vakpróbában mért átlagos érték a 0 időpontban

m_{bx} = vakpróbában mért átlagos érték az x időpontban

A 6. szakaszban a iii. + vi-ból származó nitrifikáció figyelembevételére is korrekciót kell alkalmazni.

8. **AZ OLDOTT OXIGÉN CSÖKKENÉSE AZ INOKULUM-VAKPRÓBÁBAN**

A vakpróba által felvett oxigén: ($m_{bo} - m_{b28}$) mg/liter. Ez az oxigénfelvétel fontos a vizsgálat érvényességéhez. Ennek 1,5 mg/liternél kevesebbnek kell lennie.

VII. RÉSZ **MITI-VIZSGÁLAT** (C.4-F. Módszer)

VII.1. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyag tenyészközegben létrehozott, különlegesen tenyésztett, nem adaptált mikroorganizmusokkal beoltott, folyamatosan kevert oldatában vagy szuszpenziójában az oxigénfelvételt 28 napos időtartamon át egy elsötétített, zárt, automata, 25 ± 1 °C hőmérsékleten tartott respirométerben mérik. A fejlődött szén-dioxidot nátronmésszel nyeletik el. A biológiai lebonthatóságot az elméleti oxigénfelvétel (ThOD) százalékos felvételeként (a vakpróba felvételének figyelembevételével) kell kifejezni. Az elméleti biológiai lebonthatóság mértékét is ki kell számítani az inkubációs periódus kezdetén és végén végrehajtott kiegészítő specifikus kémiai elemzésből, és/vagy más lehetőségként, a DOC-elemzésből.

VII.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

VII.2.1. **Készülék**

a) Szokásos körülmények között 6 darab, egyenként 300 ml-es és a CO_2 abszorbens elhelyezésére szolgáló készüléket tartalmazó palackkal felszerelt respirométer vagy automata elektrolitikus BOD-mérő;

▼B

b) Klímakamra és/vagy vízfürdő 25 °C ± 1 °C vagy ennél nagyobb pontosságú;

c) Membránszűrő készülék (választható);

d) Szénanalizátor (választható).

VII.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A következő törzsoldatokat kell elkészíteni analitikai minőségű reagensek és víz használatával (I.6.1.):

a) Kálium-dihidrogén-foszfát, KH_2PO_4 8,50 g

Dikálium-hidrogén-foszfát, K_2HPO_4 21,75 g

Dinátrium-hidrogén-foszfát-dodekahidrát Na_2HPO_4 12 H_2O 44,60 g

Ammónium-klorid, NH_4Cl 1,70 g

Ezen anyagokat vízben kell feloldani, és 1 literre kiegészíteni.

Az oldat pH-értékének 7,2-nek kell lennie.

b) Magnézium-szulfát-heptahidrát, $MgSO_4$ 7 H_2O 22,50 g

Vízben kell feloldani, és 1 literre kiegészíteni.

c) Kalcium-klorid, vízmentes, $CaCl_2$ 27,50 g

Vízben kell feloldani, és 1 literre kiegészíteni.

d) Vas(III)klorid-hexahidrát, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

Vízben kell feloldani, és 1 literre kiegészíteni.

Az (a), (b), (c) és (d) oldatok közül mindegyikből 3 ml-t kell venni, és kiegészíteni 1 literre.

VII.2.3. **Az inokulum előkészítése**

Friss mintákat kell tíznél nem kevesebb helyről összegyűjteni, főleg olyan területekről, ahol különböző kémiai anyagokat használnak és bocsátanak ki. 1 liternyi szennyvíziszap, felszíni víz, talaj stb. mintákat kell begyűjteni olyan helyekről, mint például szennyvíztisztító, ipari szennyvízkezelő telepek, folyók, tavak, tengerek, és ezeket alaposan össze kell keverni. A lebegő, úszó anyag eltávolítása után a mintát állni kell hagyni, majd a felülúszó folyadék pH-ját 7 ± l-re kell beállítani nátrium-hidroxid vagy foszforsav hozzáadásával.

Megfelelő térfogatú, szűrt felülúszó folyadékot eleveniszapot tartalmazó tartályba kell beletölteni, majd ezt körülbelül 23 1/2 órán át kell levegőztetni. A levegőztetés leállítása után 30 perccel ki kell engedni a felülúszó folyadék teljes térfogatának körülbelül egyharmadát, és ennek helyére ezzel egyenlő térfogatú, glükózból, peptonból és kálium-foszfátból egyaránt 0,1 %-ot tartalmazó (7-es pH-jú) oldatot kell a leülepedett anyaghoz hozzáadni, ezután újra kell kezdeni a levegőztetést. Minden nap egyszer ismételik meg ezt az eljárást. A szennyvíziszap-fermentort a jól bevált gyakorlatnak megfelelően kell működtetni: a kifolyó szennyvízből nyert folyadékoknak tisztáknak kell lenniük, a hőmérsékletet 25 ± 2 °C-on kell tartani, a pH-nak 7 ± l-nek kell lennie, a szennyvíziszapnak jól leülepedettnek kell lennie, elegendő levegőztetést kell biztosítani, hogy a keverék állandóan aerob állapotban legyen, jelen kell lenniük protozoáknak, és legalább minden harmadik hónapban meg kell vizsgálni a szennyvíziszap aktivitását valamely referenciaanyaggal összevetve. Szennyvíziszap nem használható inokulumként, amíg legalább egy hónap el nem telt a működtetés kezdete óta, de nem használható fel négy hónapnál később sem. Ezután rendszeres időközönként, minden három hónapban egyszer, legalább 10 helyről mintát kell venni.

▼B

Össze kell keverni a használatban lévő eleveniszap szűrt, felülúszó folyadékát a frissen gyűjtött, tíz forrásból származó keverék ezzel egyenlő térfogatú, szűrt, felülúszó folyadékával, és az egyesített folyadékot a fentieknek megfelelően tovább kell tenyészteni azért, hogy ugyanolyan aktivitáson tartsák a friss és régi iszapot. Az egységbe történő betöltés után 18–24 órával ki kell venni az inokulumként használni kívánt iszapot.

VII.2.4. **A lombikok előkészítése**

Az alábbi hat lombikot kell előkészíteni:

1. számú: a vizsgált anyag hígítóvízben, 100 mg/liter koncentrációban

2., 3. és 4. számú: a vizsgált anyag ásványianyag-tápoldatban, 100 mg/liter koncentrációban

5. számú: referenciaanyag (például anilin) ásványianyag-tápoldatban, 100 mg/liter koncentrációban

6. számú: csak ásványianyag-tápoldat.

A rosszul oldódó vizsgált anyagokat közvetlenül kell bevinni tömeg vagy térfogat alapon, vagy azokat a 3. függelékben leírt módon kell kezelni, kivéve hogy sem oldószereket, sem pedig emulgeátorokat nem szabad használni. A CO_2-abszorbenst az erre a célra biztosított specifikus tartókban kell bevinni minden lombikba. A pH-t 7,0-ra kell beállítani a 2., 3. és 4. lombikban.

VII.2.5. **A vizsgálat végrehajtása**

Be kell oltani a 2., 3. és 4. (vizsgált szuszpenzió), 5. (eljáráskontroll) és 6. (inokulum-vakpróba) lombikokat kis térfogatú oltóanyaggal úgy, hogy 30 mg/l szuszpendált szilárd anyagot kapjanak. Az 1. lombikhoz, amely abiotikus kontrollként szolgál, nem kell inokulumot adni. Össze kell állítani a berendezést, ellenőrizni kell a légmentes záródást, elindítani a keverőt, majd megkezdeni az oxigénfelvétel mérését sötétséget biztosítva. Naponta ellenőrizni kell a hőmérsékletet, a keverőt és a coulometriás oxigénfelvétel-mérőt, valamint fel kell jegyezni a lombikok tartalmának minden változását. Le kell olvasni közvetlenül a hat lombikhoz tartozó oxigénfelvételt valamilyen megfelelő módszerrel, például a hatpontos szalagos, öníró műszer segítségével, amely létrehoz egy BOD-görbét. Az inkubációs periódus végén, általában a 28. napon, meg kell mérni a lombikok tartalmának pH-ját, és meg kell határozni a maradék vizsgált anyag és minden közbenső anyag koncentrációját, a vízben oldható anyagok esetében a DOC-koncentrációt (2. függelék 4. pontja). Különleges gondossággal kell eljárni az illékony kémiai anyagok esetében. Ha nitrifikáció várható, meg kell határozni a nitrát- és a nitritkoncentrációt, ha lehetséges.

VII.3. ADATOK ÉS VIZSGÁLATI JELENTÉS

VII.3.1. **Az eredmények kiértékelése**

Adott időt követően el kell osztani a vizsgált anyag által felvett oxigén tömegét (mg) (az ugyanennyi idő után a vakpróbainokulum-kontroll által felvett oxigén figyelembevételével végrehajtott korrekció után) a felhasznált vizsgált anyag tömegével. Ezzel megkapják a mg oxigén/mg vizsgált anyag hányadosaként kifejezett BOD-t, azaz:

$$\text{BOD} = \frac{\text{a vizsgált anyag által felvett } O_2 \text{ [mg]} - \text{a vakpróba által felvett } O_2 \text{ [mg]}}{\text{vizsgált anyag lombikban [mg]}}$$

= mg O_2/mg vizsgált anyag

▼B

A százalékos biológiai lebomlást a következő összefüggésből lehet kiszámítani:

$$\%\ \text{biológiai lebomlás} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg kémiai anyag)}}{\text{ThOD (mg } O_2/\text{mg kémiai anyag)}} \times 100$$

Keverékek esetében elemanalízisből lehet kiszámítani a ThOD-t ugyanúgy, mint egyszerű vegyületek esetén. A használandó ThOD-érték ($ThOD_{NH4}$ vagy $ThOD_{NO3}$) attól függ, hogy nincs jelen vagy teljes-e a nitrifikáció (2. függelék 2. pontja). Azonban, ha előfordul nitrifikáció, de ez nem teljes, korrekciót kell végrehajtani annak az oxigénnek a figyelembevételével, amelyet a nitrit és a nitrát koncentrációiban létrejövő változásokból kiszámított nitrifikáció fogyaszt el (5. függelék).

A százalékos elsődleges biológiai lebomlást a specifikus (kiindulási) anyag veszteségéből (lásd az I.7.2. pontot) lehet kiszámítani.

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \ \%$$

Ha a vizsgált anyagra vonatkozóan veszteség fordult elő fizikai-kémiai okokra visszavezethetően az 1. lombikban, ezt fel kell jegyezni a jelentésbe, és a vizsgált anyagnak az e lombikban a 28. nap után meglévő koncentrációját (S_b) kell használni a százalékos biológiai lebomlás kiszámításához.

A DOC-meghatározások végrehajtásakor (választható) ki kell számítani a százalékos végső biológiai lebomlást a következő összefüggésből:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \ \%$$

úgy, ahogyan ezt az I.7.1. pont ismerteti. Ha DOC-csökkenés fordult elő az 1. lombikban, amely a fizikai-kémiai okokból bekövetkező csökkenést méri, akkor az e lombikban lévő DOC-koncentrációt kell használni a százalékos biológiai bomlás kiszámítására.

Minden eredményt fel kell jegyezni a mellékelt adatlapokra.

VII.3.2. **Az eredmények érvényessége**

Az inokulum-vakpróba oxigénfelvétele általában 20–30 mg O_2/l, és nem szabad 60 mg/l-nél nagyobbnak lennie 28 nap alatt. 60 mg/l-nél magasabb értékek esetében alaposan meg kell vizsgálni az adatokat és a kísérleti módszereket. Ha a pH-érték a 6–8,5-ös tartományon kívül van, és a vizsgált anyag oxigénfogyasztása kevesebb mint 60 %, a vizsgálatot meg kell ismételni a vizsgált anyag kisebb koncentrációjával.

Lásd még az I.5.2. pontot is.

Ha az anilinnek az oxigénfogyasztásból kiszámított százalékos lebomlása nem lépi túl a 40 %-ot 7 nap után és a 65 %-ot 14 nap után, a vizsgálatot érvénytelennek kell tekinteni.

VII.3.3. **Vizsgálati jelentés**

Lásd az I.8. pontot.

VII.4. ADATLAP

Példa az adatlapra.

MITI (I) VIZSGÁLAT

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

▼B

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat-koncentráció: … mg/l, az anyagra vonatkoztatva

Kezdeti koncentráció a médiumban: … mg/l az anyagra vonatkoztatva

Reakciókeverék térfogata, V: … ml

ThOD: … mg O_2/l

4. **INOKULUM**

Iszapminta-vételi helyek:

1. …
2. …
3. …
4. …
5. …
6. …
7. …
8. …
9. …
10. …

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja az eleveniszapban mesterséges szennyvízzel végrehajtott akklimatizáció után = … mg/l

Eleveniszap térfogata 1 liter végső közegben = … ml

Szennyvíziszap koncentrációja a végső közegben = … mg/l

5. **OXIGÉNFELVÉTEL: BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG**

A vizsgálathoz használt respirométer típusa:

			Idő (nap)				
			0	7	14	21	28
O_2-felvétel (mg), vizsgált anyag	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2-felvétel (mg), vakpróba	b						
Korrigált O_2-felvétel (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $(a_3 - b)$						
BOD mg vizsgált anyagonként	$\frac{(a - b)}{C_o V}$	1. lombik					
		2. lombik					
		3. lombik					
% lebomlás $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		Átlag (*)					

(*) Nem átlagolható, ha jelentős eltérés van az ismételt méréssel kapott értékek között.

▼B

Megjegyzés: Hasonló formátumok használhatók a referenciavegyülethez.

6. **SZÉNANALÍZIS** (választható)

Szénanalizátor:

Lombik	DOC				% DOC-csökkenés	Átlag
	Mért		Korrigált			
Viz + vizsgált anyag	a				—	—
Iszap + vizsgált anyag	b_1		$b_1 - c$			
Iszap + vizsgált anyag	b_2		$b_2 - c$			
Iszap + vizsgált anyag	b_3		$b_3 - c$			
Kontrollvakpróba	c		—		—	—

$$\%\ \text{DOC} - \text{csökkenés} = \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **SPECIFIKUS KÉMIAI ELEMZÉSBŐL SZÁRMAZÓ ADATOK**

	Vizsgált anyag maradékmennyisége a vizsgálat végén	% lebomlás
Vakpróba vizsgálat vízzel	S_b	
Beoltott közeg	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\%\ \text{lebomlás} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Ki kell számítani a % lebomlást az a_1-es, a_2-es, illetve a_3-as lombikhoz.

8. **MEGJEGYZÉSEK**

Mellékelni kell az idő függvényében felrajzolt BOD-görbét, ha az rendelkezésre áll.

▼B

1. függelék

RÖVIDÍTÉSEK ÉS FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

DO: Oldott oxigén: (mg/l) az oldott oxigén koncentrációja valamely vizes mintában.

BOD: Biokémiai oxigénigény: valamely vizsgált vegyület metabolizálásakor a mikroorganizmusok által felhasznált oxigén mennyisége; g oxigénfelvétel/g vizsgált vegyületként kifejezve is használják, (lásd a C.5. módszert).

COD: Kémiai oxigénigény (g): valamely vizsgált vegyületnek forró, savas, dikromáttal végrehajtott oxidálása során felvett oxigén mennyisége; megadja a jelen lévő oxidálható anyag mennyiségének mértékét; oxigénfelvétel (g)/vizsgált vegyület (g) formában is használják. (lásd a C.6. módszert).

DOC: Oldott szerves szén: az oldatban jelen lévő szerves szén, amely átszűrhető 0,45 mikrométeres szűrőn, vagy 15 percig tartó 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g) intenzitású centrifugálást követően a felülúszóban marad.

ThOD: Elméleti oxigénigény (mg): valamely vegyi anyag teljes oxidálásához szükséges teljes oxigénmennyiség; a molekuláris képletből számítják ki (lásd a 2. függelék 2. pontját), és oxigénigény (mg)/vizsgált vegyület (mg) formában is használják.

$ThCO_2$: Elméleti szén-dioxid-felszabadulás (mg): az a számított szén-dioxid-mennyiség, amelynek létre kell jönnie a vizsgált vegyület ismert vagy mért széntartalmából, a teljes ásványosodás során; fejlődött szén-dioxid (mg)/vizsgált vegyület (mg) formában is használják.

TOC: Összes szerves szén: az oldatban és szuszpenzióban lévő szerves szén összege egy mintában.

IC: Szervetlen szén.

TC: Összes szén: a mintában jelen lévő szerves és szervetlen szén összege.

Elsődleges biológiai lebonthatóság:

valamely anyag kémiai szerkezetében biológiai folyamattal okozott változás, amely ezen anyag speciális tulajdonságának elvesztését eredményezi.

Teljes biológiai lebonthatóság (aerob):

az a lebomlási szint, amikor a vizsgált vegyületet teljesen felhasználják a mikroorganizmusok szén-dioxid, víz, ásványi sók és új mikrobás, sejtalkotórészek (biomassza) létrejöttét eredményezve.

Biológiailag könnyen lebontható:

olyan vegyi anyagok tetszőleges kategorizálása, amelyek megfeleltek bizonyos, a teljes biológiai lebonthatóság meghatározott szűrési vizsgálatok követelményeinek; e vizsgálatok olyan szigorúak, hogy feltételezhető, hogy az ilyen vegyületek vizes környezetekben aerob körülmények között biológiailag gyorsan és teljesen lebomlanak.

▼B

Biológiailag potenciálisan lebontható:

azoknak a vegyi anyagoknak a kategorizálása, amelyek esetében valamilyen elfogadott biológiai lebonthatóság vizsgálata során egyértelműen bizonyított a biológiai lebonthatóság (elsődleges vagy teljes).

Kezelhetőség:

biológiai szennyvízkezelés során vegyületek eltávolítás szempontjából történő kezelhetősége, anélkül, hogy káros hatással lennének a kezelési folyamat normál működésére. Általában a biológiailag gyorsan lebontható vegyületek kezelhetők, de nem minden biológiailag potenciálisan lebontható vegyület kezelhető. Abiotikus folyamatok is végbemehetnek.

Fáziskésés

valamely lebonthatósági vizsgálatban a beoltástól kezdődő és addig terjedő időtartam, amíg a lebomlási százalék legalább 10 %-ra növekedett. A fáziskésés gyakran nagyon változékony, és gyengén reprodukálható.

Lebomlási idő

a fáziskésés végétől kezdődő és addig tartó időtartam, amikor a lebomlás elérte a legnagyobb szintjének 90 %-át.

Tíznapos ablak

a 10 %-os lebomlás elérését közvetlenül követő 10 nap.

▼B

2. függelék

MEGFELELŐ ÖSSZEFOGLALÓ PARAMÉTEREK KISZÁMÍTÁSA ÉS MEGHATÁROZÁSA

A választott módszertől függően, szükség lesz bizonyos összefoglaló paraméterekre. A következő szakasz ezen értékek levezetését írja le. E paraméterek használatát az egyes módszerek ismertetik.

1. **Széntartalom**

A széntartalom az ismert elemi összetételből számítható ki, vagy a vizsgált anyag elemi analízise határozza meg.

2. **Elméleti oxigénigény (ThOD)**

Az elméleti oxigénigény (ThOD) kiszámítható, ha ismert vagy elemi analízissel meghatározásra került az elemi összetétel. A következő vegyület esetében:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

nitrifikáció nélkül,

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

vagy nitrifikációval,

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Kémiai oxigénigény (COD)**

A kémiai oxigénigényt (COD) a C.6. módszernek megfelelően kell meghatározni.

4. **Oldott szerves szén (DOC)**

Az oldott szerves szén (DOC): bármely vegyi anyagnak vagy vizes keveréknek egy 0,45 mikrométeres szűrőn átszűrhető szerves szén része.

A vizsgálati tartályokból mintákat vesznek, és a mintákat azonnal átszűrik megfelelő membránszűrő segítségével. A szűrlet első 20 ml-jét (a mennyiség csökkenthető kisméretű szűrők használatakor) elvetik. Befecskendezés esetén 10–20 ml-t vagy ennél kevesebbet (a térfogat a szénanalizátorhoz szükséges mennyiségtől függ) megőriznek a szén elemzéséhez. A DOC-koncentrációt olyan szervesszén-analizátor segítségével határozzák meg, amely a vizsgálatban használt kezdeti DOC-koncentráció 10 %-ával egyenértékű, vagy annál kisebb szénkoncentráció pontos mérésére képes.

Azok a szűrt minták, amelyek nem elemezhetők ugyanazon a munkanapon, hűtőszekrényben, 2–4 °C-os hőmérsékleten 48 óráig vagy –18 °C-os hőmérséklet alatt ennél hosszabb ideig tárolhatók.

Megjegyzések:

A membránszűrőket gyakran impregnálják felületaktív anyagokkal a hidrofilizáció biztosítására. Így tehát a szűrő akár több mg olyan oldható szerves szenet is tartalmazhat, amely befolyásolhatja a biológiai lebonthatósági vizsgálat eredményeit. A felületaktív anyagok és más, oldható szerves vegyületek eltávolíthatók a szűrőkről három, egyenként egyórás időtartamon keresztül deionizált vízben történő forralással. A szűrők ezután egy héten át vízben tárolhatók. Eldobható szűrőbetétek használatakor minden egyes adagot ellenőrizni kell, meg kell győződni arról, hogy nem szabadít-e fel oldható szerves szenet.

▼B

A membránszűrő típusától függően adszorpció útján visszamaradhat a vizsgált vegyi anyag. Ezért ajánlott ezt megelőzni.

Szűrés helyett 15 percen át 40 000 $m.sec^{-2}$ (4 000 g) melletti centrifugálás alkalmazható a TOC és DOC megkülönböztetésére. Ez a módszer nem megbízható 10 mg DOC/1 alatti kezdeti koncentrációnál, mivel vagy nem távozik el minden baktérium, vagy újraoldódik a szén a baktériumplazma részeként.

SZAKIRODALOM

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th edition, Am. Pub. H1th. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38409 Teil 41 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser-und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), NormenausschuB 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

3. függelék

ROSSZUL OLDHATÓ ANYAGOK BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁGÁNAK FELMÉRÉSE

A rosszul oldható anyagokkal végrehajtott biológiai lebonthatósági vizsgálatokban a következő szempontoknak kell különleges figyelmet szentelni.

Míg a homogén folyadékok ritkán járnak mintavételi problémákkal, ajánlatos a szilárd anyagokat megfelelő eszközökkel homogenizálni a homogenitás hiánya miatti hibák elkerülésére. Különleges gondossággal kell eljárni, amikor vegyi anyagok keverékeiből vagy nagymennyiségű szennyeződéseket tartalmazó anyagokból néhány mg-nyi reprezentatív minta szükséges.

A vizsgálatok során különböző formájú keverés használható. Gondosan kell eljárni, csak olyan mértékű keverést szabad alkalmazni, amely éppen elegendő a vegyi anyag diszpergált állapotban tartásához, és amelynél nem lép fel túlmelegedés, túlzott habzás vagy a baktériumok mechanikai károsodása.

A vegyi anyag stabil diszperzióját létrehozó emulgeálószer használható. Ez nem lehet toxikus a baktériumra, és a vizsgálati körülmények között nem szabad biológiailag lebomlania vagy habzást okoznia.

Az oldószerekre ugyanaz a követelmény érvényes, mint az emulgeálószerekre.

Nem ajánlott szilárd hordozóanyagok használata szilárd vizsgált anyagokhoz, ezek olajos anyagokhoz lehetnek alkalmasak.

Segédanyagok, ilyenek például az emulgeálószerek, oldószerek és hordozóanyagok használatakor segédanyag-vakpróbát kell végrehajtani.

A három respirometriás vizsgálat – CO_2, BOD, MITI – közül bármelyik használható a rosszul oldható vegyületek biológiai lebonthatóságának vizsgálatára.

SZAKIRODALOM

— de Morsier, A. et. al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.

— Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

▼B

4. függelék

AZ OLTÓANYAGRA FELTEHETŐEN TOXIKUS VEGYI ANYAGOK BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁGÁNAK FELMÉRÉSE

Amennyiben valamely vegyi anyagot könnyű biológiai lebonthatóság vizsgálatának vetik alá, és úgy tűnik, hogy biológiailag nem lebontható, a következő eljárás ajánlatos, amennyiben különbséget kell tenni a gátlás és a közömbösség között. (Reynolds és munkatársai, 1987)

Hasonló vagy azonos oltóanyagot kell használni a toxicitás- és a biológiai lebonthatósági vizsgálatokhoz.

A könnyű biológiai lebonthatóság megállapítására irányuló vizsgálatokban vizsgált vegyi anyagok toxicitásának értékeléséhez az iszaplégzésintenzitás-gátlási (aktivált szennyvíziszap légzésgátlási vizsgálata – 88/302/EGK irányelv), BOD- és/vagy növekedésgátló módszerek vagy ezek kombinációjának alkalmazása tűnik megfelelőnek.

Amennyiben el kell kerülni a toxicitásra visszavezethető gátlást, ajánlott a biológiailag gyors lebonthatóság megállapítására végrehajtott vizsgálatot a toxicitásvizsgálatban kapott EC_{50}-es értékek 1/10-ét (vagy az EC_{20}-értékeknél kisebbet) el nem érő vizsgálatianyag-koncentrációt alkalmazni. 300 mg/l-nél nagyobb EC_{50}-es értékű vegyületek nem valószínű, hogy toxikus hatással rendelkeznek a biológiailag gyors lebonthatóság vizsgálatában.

A 20 mg/l-nél kisebb EC_{50}-értékek valószínűleg súlyos problémákat jelentenek a későbbi vizsgálat esetében. Alacsony vizsgálati koncentrációkat kell alkalmazni, amely szükségessé teszi a szigorú és érzékeny zártpalack-vizsgálat használatát vagy a ^{14}C – címkézésű anyag használatát. Más megoldásként, valamely akklimatizált oltóanyag a vizsgált anyag magasabb koncentrációjának használatát teheti lehetővé. Az utóbbi esetben azonban elvész a biológiailag könnyű lebonthatóság vizsgálatának különös követelménye.

SZAKIRODALOM

Reynolds, L. et. al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

▼B

5. függelék

A NITRIFIKÁCIÓ OKOZTA OXIGÉNFELVÉTEL FIGYELEMBEVÉTELE

Nitrogént nem tartalmazó vizsgált anyagok biológiai lebonthatóságának oxigénfelvétellel történő értékelésében a nitrifikáció figyelmen kívül hagyása miatti hibák kismértékűek (5 %-nál nem nagyobbak) még akkor is, ha az oldószerben lévő ammónium-N oxidációja ingadozik a vizsgálati anyagot tartalmazó és a vakpróbatartályok között. Nitrogéntartalmú vizsgált anyagok esetében azonban súlyos hibák jelentkezhetnek.

Amennyiben a nitrifikáció bekövetkezett, de ez nem teljes, a reakciós keverék mért oxigénfelvétele helyesbíthető az ammónium nitritté és nitráttá oxidálásában felhasznált oxigén mennyiségével, ha a nitrit és a nitrát inkubálása során a koncentrációváltozásokat a következő egyenletek segítségével határozzák meg:

$$2\ NH_4Cl + 3O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Teljes:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Az (1) egyenletből az ammónium-kloridban (NH_4C1) lévő 28 g nitrogén oxigénfelvétele a nitritté oxidálódás során 96 g, azaz a szorzótényező 3,43 (96/28). Hasonlóképpen a (3) egyenletből látható, hogy a 28 g nitrogén oxigénfelvétele, miközben nitráttá oxidálódik, 128 g, vagyis a szorzótényező 4,57 (128/28).

Mivel a reakciók szekvenciálisak, amelyeket meghatározott és egymástól különböző baktériumfajták hajtanak végre, lehetőség van a nitrit koncentrációjának növelésére vagy csökkentésére; az utóbbi esetben létrehozható a nitrát egyenértékű koncentrációja. Így a nitrátképződés során felhasznált oxigén értéke 4,57, szorozva a nitrát koncentrációjának növekedésével, míg a nitrit képződésével kapcsolatos oxigén értéke 3,43, szorozva a nitrit koncentrációjának növekedésével, vagy a koncentrációja csökkenése esetén az oxigénveszteség - 3,43 szorozva a koncentráció csökkenéssel.

Azaz:

A nitrátképződés során felhasznált O_2 = 4,57 * a nitrátkoncentráció növekedése (4)

és

Nitritképződés során felhasznált O_2 = 3,43 * a nitritkoncentráció növekedése (5)

és

Nitritkoncentráció csökkenésekor az elvesztett O_2 = - 3,43 * a nitritkoncentráció csökkenése (6)

úgy. hogy

Nitrifikációból adódó O_2-felvétel = ± 3,43 * nitritkoncentráció-változás + 4,57 * a nitrát-koncentráció növekedése (7)

és így

C-oxidációból adódó O_2-felvétel = teljes megfigyelt felvétel – nitrifikációból adódó felvétel (8)

Amennyiben csak a teljes oxidált nitrogént határozzák meg, a nitrifikáció miatti oxigénfelvétel első megközelítésben 4,57 x oxidált N-növekedés.

A C-oxidáció következtében létrejövő oxigénfelvétel helyesbített értékét ezután összehasonlítják a ThOD NH_3-mal a 2. függelékben bemutatott számításnak megfelelően.

▼B

C.5. LEBOMLÁS – BIOKÉMIAI OXIGÉNIGÉNY

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

E módszer célja a szilárd vagy folyékony szerves anyagok biokémiai oxigénigényének (BOD) meghatározása.

A módszerrel kapott adatok vízben oldható vegyületekre vonatkoznak; azonban elvben illékony vegyületek és vízben kis mértékben oldható vegyületek is vizsgálhatók.

A módszer csak az olyan szerves anyagokhoz alkalmazható, amelyek a vizsgálatban használt koncentráció mellett nincsenek gátló hatással a baktériumokra. Amennyiben a vizsgált anyag a vizsgálati koncentráció mellett nem oldható, különleges intézkedéseket kell alkalmazni a vizsgált anyag megfelelő mértékű diszpergálása céljából, például az ultrahangos diszpergálás használatával.

A vizsgált anyag toxicitására vonatkozó információk hasznosaknak bizonyulhatnak az alacsony vizsgálati eredmények értelmezése és a megfelelő vizsgálati koncentráció kiválasztásában.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A BOD: az adott anyagot tartalmazó oldat meghatározott mennyiségének meghatározott körülmények között biokémiai oxidációjához szükséges oldott oxigén tömege.

Az eredményeket BOD gramm/vizsgált anyag gramm formájában fejezik ki.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Célszerű megfelelő referenciaanyag használata az oltóanyag aktivitásának ellenőrzése érdekében.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Alkalmas oldószerben feloldott vagy diszpergált, előre meghatározott anyagmennyiséget mikroorganizmusokkal beoltanak, és sötét helyen, állandó, meghatározott környezeti hőmérsékleten inkubálnak.

A BOD-t az oldott oxigéntartalomnak a vizsgálat elején és végén mért különbségével határozzák meg. A vizsgálat időtartamának legalább 5 napnak és legfeljebb 28 napnak kell lennie.

E vizsgálattal párhuzamosan vizsgált anyagot nem tartalmazó vakpróbát kell elvégezni.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A BOD-meghatározás nem tekinthető valamely anyag biológiai lebonthatósága érvényes meghatározásának. E vizsgálat csak screening-vizsgálatnak tekinthető.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Elkészítik az anyag oldatát vagy diszperzióját az alkalmazott módszerhez megfelelő BOD-koncentráció megállapítása érdekében. Ezután megfelelő nemzeti vagy nemzetközi szabvány alkalmazásával meghatározzák a BOD-t.

▼B

2. **ADATOK ES ÉRTÉKELÉS**

A kiválasztott standardizált módszernek megfelelően kiszámítják az induló oldat BOD-értékét, majd átszámítják ezt BOD (gramm)/vizsgált anyagra (gramm).

3. **JELENTÉS**

Meg kell adni az alkalmazott módszert.

A biokémiai oxigénigényt legalább három érvényes mérés átlagaként kell meghatározni.

Minden, az eredmények értelmezése szempontjából lényeges információt és megjegyzést meg kell adni, különös tekintettel az anyag szennyeződéseire, fizikai állapotára, toxikus hatásaira és jellemző összetételére, amely befolyásolhatja az eredményt.

A vizsgálati jelentésben fel kell tüntetni, ha a biológiai nitrifikáció gátlása céljából segédanyagot használnak.

4. SZAKIRODALOM

Szabványok jegyzéke, például:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: 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. LEBOMLÁS – KÉMIAI OXIGÉNIGÉNY

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

E módszer célja szilárd vagy folyékony szerves anyagok kémiai oxigénigényének (COD) mérése tetszőleges, standardizált módon megállapított laboratóriumi körülmények mellett.

Az anyag képletére vonatkozó információk hasznosak e vizsgálat végrehajtásához és a kapott eredmények értelmezéséhez (például klórozott szerves vegyületek, szerves vegyületek vassói, halogénsók).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A kémiai oxigénigény valamely anyag oxidálhatóságának a mértéke, meghatározott laboratóriumi körülmények között az anyag által felhasznált valamilyen oxidáló reagenssel egyenértékű oxigénmennyiségben kifejezve.

Az eredményt COD (gramm)/vizsgált anyag (gramm) formában fejezik ki.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagokat alkalmazni. Ezeknek elsősorban a módszer megfelelőségének időnkénti ellenőrzésére és arra kell szolgálniuk, hogy lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel kapott eredményekkel.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Vízben feloldott vagy diszpergált, előre meghatározott anyagmennyiséget oxidálnak erős kénsavoldatban lévő kálium-dikromáttal, ezüst-szulfátot használva katalizátorként, két órán át reflux mellett. Szabványosított, vas-ammónium-szulfáttal végrehajtott titrálással meghatározzák a maradék dikromátot.

Klórtartalmú anyagok esetében hozzáadnak higany-szulfátot ([1]), a klorid okozta zavaró hatás csökkentésére.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A meghatározás tetszőleges módja miatt a COD-t „oxidálhatósági mérőszámnak” kell tekinteni, és mint ilyet, gyakorlati módszerként használják szerves anyag mérésére.

A klorid zavarhatja e vizsgálatot; továbbá a szervetlen redukálóvagy oxidálószerek is befolyásolhatják a COD-meghatározást.

Néhány gyűrűs vegyületet és sok illékony anyagot (például alacsony szénatomszámú zsírsavak) nem teljesen oxidál ez a vizsgálat.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Elkészítik az anyag oldatát vagy diszperzióját 250 és 600 mg/l közötti COD létrehozására.

([1]) A higanysókat tartalmazó oldatokat használat után megfelelő módon kell kezelni, hogy a higany ne kerüljön ki a környezetbe.

▼B

Megjegyzések:

Rosszul oldódó és nem diszpergálható anyagok esetében kimérhető körülbelül 5 mg COD-nek megfelelő, finomra porított anyag vagy folyékony anyag, és vízzel együtt a kísérleti berendezésbe helyezhető.

Gyakran és különösen a rosszul oldódó anyagok esetében a kémiai oxigénigény (COD) előnyösen meghatározható a módszer egyik változatával, azaz egy nyomáskiegyenlítővel ellátott zárt rendszerben (H. Kelkenberg, 1975). E módosított változattal gyakran mennyiségileg sikeresen határozhatók meg azok a vegyületek, amelyek a hagyományos módszerrel csak nehezen határozhatók meg – ilyen például az ecetsav. Azonban ez a módszer sem alkalmas piridin esetében. Amennyiben az (1) szakirodalomban előírt módon a kálium-dikromát koncentrációt 0,25 N-re (0,0416 M) növelik, ez megkönnyíti az anyag 5–10 mg-os mennyiségének közvetlen bemérését, amely lényeges a vízben rosszul oldódó anyagok COD-értékének meghatározásához ((2) szakirodalom)).

A COD-t ezután valamilyen alkalmas nemzeti vagy nemzetközi szabványt követve kell meghatározni.

2. **ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS**

A kísérleti lombikban lévő COD-t a kiválasztott standardizált módszer segítségével kell kiszámítani és átszámítani COD (gramm)/vizsgált anyag (gramm) formába.

3. **JELENTÉS**

Meg kell adni a használt referencia-módszert.

A kémiai oxigénigényt legalább három mért érték középértékeként kell megadni. Minden, az eredmények értelmezése szempontjából lényeges információt és megjegyzést meg kell adni, különösen az anyag szennyeződéseivel, fizikai állapotával és jellemző tulajdonságaival kapcsolatosakat (amennyiben ismertek), amelyek hatással lehetnek az eredményekre.

Amennyiben a klorid befolyásoló hatásának minimalizálása céljából higany-szulfátot használnak, ezt is meg kell adni a vizsgálati jelentésben.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

A szabványok jegyzéke, például:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN 0 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. LEBOMLÁS – ABIOTIKUS LEBOMLÁS: HIDROLÍZIS A PH FÜGGVÉNYÉBEN

1. MÓDSZER

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 111 (2004) vizsgálattal.

1.1. BEVEZETÉS

Vegyszerek többféle úton juthatnak a felszíni vizekbe: közvetlen bejuttatással, permetezett anyag elsodródásával, beömléssel, a csapadékvíz-elvezető rendszerből, hulladéklerakással, ipari, háztartási vagy mezőgazdasági szennyvizekkel, légköri lerakódás útján; a felszíni vizekbe jutó vegyszerek a vízben kémiai (pl. hidrolízis, oxidáció), fotokémiai és/vagy mikrobiális folyamatokkal átalakulhatnak. Ez az útmutató az (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) útmutatások alapján olyan laboratóriumi vizsgálati módszert mutat be, amely a környezetben rendszerint előforduló pH-értékek (4–9) mellett a vegyszerek vizes közegben lejátszódó abiotikus hidrolízises átalakulásának vizsgálatára alkalmas.

A vizsgálat célja i. a pH-érték függvényében a vizsgált anyag hidrolízissebességének meghatározása; ii. azon hidrolízistermékek mibenlétének, illetőleg képződési és csökkenési sebességének meghatározása, amelyekkel élő szervezetek találkozhatnak. Ezekre a vizsgálatokra olyan vegyi anyagok esetében lehet szükség, amelyek közvetlenül a vízbe jutnak, illetőleg az említett más módokon a környezetbe kerülhetnek.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A 2. függelék szerint.

1.3. A MÓDSZER ALKALMAZHATÓSÁGA

A módszer általában olyan (jelzés nélküli vagy jelölt) vegyi anyagokra alkalmazható, amelyek kimutatására megfelelő pontosságú és érzékenységű analitikai módszer áll rendelkezésre. Enyhén illékony és nem illékony, vízben megfelelően oldható vegyületekre egyaránt alkalmazható. A módszert nem szabad olyan vegyi anyagokra alkalmazni, amelyek vízben fokozottan illékonyak (pl. gáznemű növényvédő szerek, szerves oldószerek), ezért a vizsgálat során érvényesülő kísérleti körülmények között nem tarthatók oldatban. A vizsgálat nehezen végezhető vízben csekély mértékben oldódó anyagokkal (8).

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Különböző pH-értékű (4, 7 és 9) steril vizes pufferoldatokat a vizsgálandó anyaggal kezelünk, majd sötétben, ellenőrzött laboratóriumi körülmények között (állandó hőmérsékleten) inkubáljuk őket. A pufferoldatokban lévő vizsgált anyagot és a hidrolízistermékeket megfelelő időközönként elemezzük. A tömegmérleg könnyebben meghatározható, ha a vizsgált anyag jelölt (pl. ^{14}C-vel).

A vizsgálati módszer többfokozatú, működését az 1. függelék mutatja be és magyarázza el. Az egyes fokozatok szükségességét a megelőző fokozat eredményei határozzák meg.

▼B

1.5. INFORMÁCIÓK A VIZSGÁLT ANYAGRÓL

A hidrolízis sebességének mérése jelzés nélküli vagy jelölt anyagon végezhető el. A jelölt anyag általában a hidrolízis folyamatának tanulmányozása és a tömegmérleg megállapítása szempontjából előnyös, ugyanakkor speciális esetekben a jelölés nem feltétlenül szükséges. A jelölést ^{14}C-vel célszerű végezni, de más izotóp, például ^{13}C, ^{15}N vagy ^{3}H is alkalmazható. Amennyire csak lehet, a jelölést a molekula legstabilabb részében vagy részeiben kell elhelyezni. Ha például a vizsgált anyag egygyűrűs, akkor a jelölést ebben a gyűrűben kell elhelyezni; ha a vizsgált anyag két vagy több gyűrűt tartalmaz, akkor célszerű lehet külön vizsgálatok révén tanulmányozni az egyes jelölt gyűrűk sorsát, hogy megfelelő információkat nyerjünk a hidrolízistermékek képződéséről. A vizsgálandó anyag tisztasága legyen legalább 95 %.

A hidrolízisvizsgálat elvégzéséhez ismerni kell a vizsgált anyag:

a) vízben való oldhatóságát (A.6. vizsgálati módszer);

b) szerves oldószerekben való oldhatóságát;

c) gőznyomását (A.4. vizsgálati módszer) és/vagy Henry-állandóját;

d) n-oktanol/víz megoszlási együtthatóját (A.8. vizsgálati módszer);

e) disszociációállandóját (pK_a) (OECD 112. útmutató) (9);

f) közvetlen és közvetett fototranszformációjának sebességét vízben (szükség esetén).

Rendelkezésre kell állniuk a vizsgált anyag mennyiségi meghatározására, valamint szükség szerint a vizes oldatokban keletkező hidrolízistermékek mibenlétének és mennyiségének meghatározására alkalmas analitikai módszereknek (lásd még az 1.7.2. szakaszt).

1.6. REFERENCIAANYAGOK

A hidrolízistermékek mibenlétének és mennyiségének spektroszkopikus és kromatográfiás vagy egyéb, kellő érzékenységű módszerekkel történő meghatározásához lehetőség szerint referenciaanyagokat kell használni.

1.7. MINŐSÉGI KRITÉRIUMOK

1.7.1. **Visszanyerés**

A vizsgált anyag hozzáadását követően azon nyomban, legalább két párhuzamos pufferoldaton vagy kivonaton végzett elemzés kiindulási információval szolgál az analitikai módszer megismételhetőségéről és a vizsgált anyag bevitelére alkalmazott eljárás egységességéről. A vizsgálat későbbi fázisaiban a visszanyerést a tömegmérlegek adják meg (jelölt anyag használata esetén). Jelölt és nem jelölt anyagok esetén a visszanyerésértékeknek 90 % és 110 % között kell lenniük (7). Ha műszakilag nehéz ezt a tartományt elérni, akkor nem jelölt anyag esetén kellő indoklással 70 %-os visszanyerés is elfogadható.

▼B

1.7.2. **Az analitikai módszer megismételhetősége és érzékenysége**

A vizsgált anyag és a hidrolízistermékek mennyiségi meghatározására alkalmazott analitikai módszer(ek) megismételhetősége utólag úgy ellenőrizhető, hogy akkor, amikor már a mennyiségek meghatározásához elegendő hidrolízistermék keletkezett, ugyanazt a puffer-oldatot (vagy kivonatát) ismételt elemzésnek vetjük alá.

Az analitikai módszer érzékenységének olyannak kell lennie, hogy a vizsgált anyag mennyiségének meghatározását akkor is biztosítsa, amikor annak koncentrációja a kezdeti koncentráció 10 %-ára vagy még kisebb értékre lecsökkent. Az adott esetnek megfelelően az analitikai módszereknek olyan érzékenységűnek kell lenniük, hogy (a vizsgálat során bármikor) a csúcskoncentráció 25 %-áig vagy egy annál kisebb értékig lehetővé tegyék az alkalmazott dózis legalább 10 %-át kitevő hidrolízistermékek mennyiségének meghatározását.

1.7.3. **A hidrolízis kinetikai adatainak konfidenciaintervalluma**

Minden regressziós együttható, reakciósebességi állandó, felezési idő és bármilyen más kinetikai paraméter (pl. DT_{50}) esetében ki kell számítani és be kell mutatni a konfidenciaintervallumokat.

1.8. A VIZSGÁLT MÓDSZER LEÍRÁSA

1.8.1. **Készülékek és műszerek**

A vizsgálatokat szükség szerint üvegedényekben (pl. kémcsövekben, kis palackokban) kell elvégezni sötét és steril körülmények között, kivéve akkor, ha korábbról olyan információk állnak rendelkezésre (például az n-oktanol/víz megoszlási együttható alapján), hogy a vizsgált anyag az üveghez tapadhat. Ilyenkor célszerű lehet megfontolni más anyag (például teflon) alkalmazását. Az üveghez tapadás problémája a következő módszerek valamelyikével vagy egyszerre többel is csökkenthető lehet:

— a vizsgálati edényhez szorbeálódott hidrolízistermékek és a vizsgált anyag tömegének meghatározásával,

— ultrahangos fürdő alkalmazásával,

— az egyes mintavételek időpontjában az üvegedények oldószerrel történő elmosásával,

— formulázott termékek használatával,

— több társoldószer alkalmazásával a vizsgált anyag rendszerhez adagolásakor (az alkalmazott társoldószer nem hidrolizálhatja a vizsgált anyagot).

A különböző vizsgálati oldatok inkubálásához rendszerint szabályozott hőmérsékletű vízfürdőrázóra vagy termosztatikusan szabályozott inkubátorra van szükség.

Standard laboratóriumi felszerelés szükséges, beleértve különösen a következőket:

— pH-mérő,

▼B

— analitikai eszközök, mint például GC-, HPLC-, TLC-berendezés, beleértve a radioaktív és nem jelölt anyagok elemzésére alkalmas, illetve az inverz izotópos hígításos módszerben szükséges kimutatási rendszereket,

— az anyagok mibenlétének meghatározására alkalmas eszközök (pl. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR stb.),

— folyadékszcintillációs számláló,

— választótölcsérek a folyadék-folyadék extrakcióhoz,

— műszerek oldatok és kivonatok koncentrálására (pl. forgó bepárló),

— hőmérséklet-szabályozó eszköz (pl. vízfürdő).

A kémiai reagensek között szükség van például:

— analitikai tisztaságú szerves oldószerekre: hexánra, diklórmetánra stb.,

— szcintillációs folyadékra,

— pufferoldatokra (részletesebben lásd az 1.8.3. szakaszban).

A hidrolízis során használt minden üveget, reagens tisztaságú vizet és pufferoldatot sterilizálni kell.

1.8.2. **A vizsgált anyag bevitele**

A vizsgált anyagot vizes oldat formájában kell a különböző pufferoldatokba bevinni (lásd a 3. függeléket). Ha a megfelelő oldódáshoz szükséges, a vizsgált anyag beviteléhez kis mennyiségű, vízzel elegyedő oldószer (pl. acetonitril, aceton, etanol) is felhasználható, de ennek mennyisége rendszerint legfeljebb 1 térfogatszázalék lehet. Nagyobb koncentrációjú oldószer alkalmazása csak akkor engedhető meg (például rosszul oldódó vizsgált anyag esetén), ha kimutatható, hogy az oldószernek nincs hatása a vizsgált anyagok hidrolízisére.

Formulázott terméket rutinszerűen nem ajánlatos használni, mivel nem zárható ki, hogy a formulázási összetevők befolyásolják a hidrolízis folyamatát. Ugyanakkor vízben rosszul oldódó vizsgált anyag vagy az üveghez hozzátapadó anyag esetében (lásd az 1.8.1. szakaszt) a formulázott anyag megfelelő alternatívát jelenthet.

A vizsgált anyagból egyetlen koncentrációt kell használni; ez a koncentráció nem haladhatja meg a 0,01 M-t vagy a telítettségi koncentráció felét (lásd az 1. függeléket).

▼B

1.8.3. **Pufferoldatok**

A hidrolízisvizsgálatot három pH-értéken kell végrehajtani: 4, 7 és 9. Ehhez reagens tisztaságú vegyi anyagok és víz felhasználásával pufferoldatokat kell készíteni. A 3. függelék bemutat néhány hasznos pufferrendszert. Megjegyzendő, hogy az alkalmazott pufferrendszer hatással lehet a hidrolízis sebességére, ezért ha ilyen hatást észlelünk, akkor másik pufferrendszert kell igénybe venni ([1]).

Az egyes pufferoldatok pH-értékét kalibrált pH-mérővel az előírt hőmérsékleten legalább 0,1 pH pontossággal ellenőrizni kell.

1.8.4. **Vizsgálati körülmények**

1.8.4.1. *Vizsgálati hőmérséklet*

A hidrolízisvizsgálatokat állandó hőmérsékleteken kell elvégezni. Az extrapoláció szempontjából fontos, hogy a hőmérséklet ± 0,5°C-os tartományon belül maradjon.

Ha a vizsgált anyag hidrolitikus viselkedése nem ismert, 50 °C-os hőmérsékleten elővizsgálatot (1. fokozat) kell végezni. A magasabb fokozatú kinetikai vizsgálatokat legalább három hőmérsékleten (beleértve az 50 °C-on elvégzett vizsgálatot is) kell elvégezni, kivéve akkor, ha az 1. fokozatú vizsgálatban a vizsgált anyag hidrolízis szempontjából stabilnak mutatkozott. Hőmérséklet-tartományként 10–70 °C-ot javaslunk (lehetőleg legalább egy hőmérsékletérték 25 °C-nál kisebb legyen), ugyanis ebben a tartományban mind a 25 °C-os referenciahőmérséklet, mind a területen előforduló legtöbb hőmérséklet megtalálható.

1.8.4.2 *Fényviszonyok és oxigén*

A hidrolízisvizsgálatok során a fotolitikus hatásokat tetszőleges, erre alkalmas módszerrel ki kell zárni. Mindent meg kell tenni az oxigén elkerülése érdekében (például az oldat elkészítése előtt 5 percig hélium, nitrogén vagy argon buborékoltatásával).

1.8.4.3. *A vizsgálat időtartama*

Az elővizsgálatot 5 napig, a magasabb fokozatú vizsgálatokat a vizsgált anyag 90 %-os hidrolizálásáig, de legfeljebb 30 napig kell végezni.

1.8.5. **A vizsgálat végrehajtása**

1.8.5.1. *Elővizsgálat (1. fokozat)*

Az elővizsgálatot 50 ± 0,5°C-on és 4,0, 7,0 és 9,0 pH-értékeken végezzük. Ha 5 nap után a hidrolízis mértéke 10 %-nál kisebb ($t_{0,5\ 25\ °C}$ > 1 év), akkor a vizsgált anyag hidrolízis szempontjából stabilnak tekintendő, és rendszerint nincs szükség további vizsgálatokra. Ha tudjuk, hogy az anyag környezeti szempontból releváns hőmérsékleteken instabil ([2]), akkor az elővizsgálatot nem kell elvégezni. Az analitikai módszernek kellő pontosságúnak és érzékenységűnek kell lennie ahhoz, hogy a kezdeti koncentráció 10 %-os csökkenése kimutatható legyen.

([1]) Mabey és Mill foszfát helyett borát- vagy acetátpufferek alkalmazását javasolja (11).

([2]) Erre vonatkozó információ más forrásokból, például szerkezetileg hasonló vegyületek szakirodalmi hidrolízisadataiból vagy a vizsgált anyaggal korábban elvégzett félkvantitatív hidrolízisvizsgálatokból is származhat.

▼B

1.8.5.2. *Instabil anyagok hidrolízise (2. fokozat)*

A magasabb fokozatú (részletesebb) vizsgálatot azokon a pH-értékeken kell elvégezni, amelyeken a vizsgált anyag a fenti elővizsgálatban instabilnak mutatkozott. A vizsgált anyag pufferelt oldatait a kiválasztott hőmérsékleteken kell tartani. Az elsőrendű viselkedés vizsgálatához minden reakcióoldatot rendesen olyan időközönként kell elemezni, hogy a vizsgált anyag 10 %-os és 90 %-os hidrolízise között legalább hat, egymástól kellő távolságban elhelyezkedő adatpontot kapjunk. Az egyes párhuzamos vizsgálati mintákat (külön reakcióedényekben tartott legalább két azonos mintát) legalább hat-hat mintavételi időpontban ki kell venni az edényből, és mindegyik minta tartalmát elemezni kell (így legalább tizenkét párhuzamos adatpontot nyerünk). Nem helyes eljárás, ha a párhuzamos mintákat egyetlen nagy minta egyenlő részekre osztásával állítjuk elő, és ezeket vizsgáljuk az egyes mintavételi időpontokban, mert ily módon nincs lehetőség az adatok változatosságának elemzésére, és a vizsgálati oldat szennyeződése is problémát jelenthet. A magasabb fokozat végén (azaz a 90 %-os hidrolízis elérése után vagy 30 nap elteltével) külön vizsgálattal ellenőrizni kell a sterilitást. Ha azonban bomlást (átalakulást) nem tapasztalunk, a sterilitást nem szükséges külön vizsgálni.

1.8.5.3. *A hidrolízistermékek meghatározása (3. fokozat)*

Minden olyan hidrolízisterméket, amely legalább az alkalmazott dózis 10 %-ának megfelelő mennyiségben keletkezik, megfelelő analitikai módszerrel azonosítani kell.

1.8.5.4. *Kiegészítő vizsgálatok*

Hidrolízis szempontjából instabil vizsgált anyag esetében szükséges lehet a 4, 7 és 9 pH-értéktől eltérő pH-értékeken is vizsgálatokat végezni. Fiziológiai megfontolásból például előfordulhat, hogy savasabb körülmények (pl. pH =1,2) közötti, fiziológiai szempontból releváns hőmérsékleten (37 ^{o}C) is kell vizsgálatot végrehajtani.

2. **ADATOK**

A vizsgált anyagok és a hidrolízistermékek (ha vannak) mennyiségét minden mintavételi időpontra, minden pH-értékre és hőmérsékletre vonatkozóan az alkalmazott kezdeti koncentráció százalékában, illetőleg szükség szerint mg/l-ben is meg kell adni. Jelölt vizsgált anyag esetén az alkalmazott kezdeti koncentráció százalékában a tömegmérleget is meg kell adni.

A jegyzőkönyvben a vizsgált anyag koncentrációinak értékét grafikusan, az idő függvényében logaritmikus léptékben ábrázolva kell megadni. Meg kell határozni a legalább az alkalmazott dózis 10 %-ának megfelelő mennyiségben keletkező hidrolízistermékek mibenlétét, és a vizsgált anyag mennyiségeit jelző koordináta-rendszerben logaritmikus léptékben ábrázolni kell mennyiségüket, ezzel szemléltetve keletkezésük és csökkenésük sebességét.

▼B

2.1. AZ EREDMÉNYEK FELDOLGOZÁSA

Megfelelő kinetikai modellszámításokkal a felezési időt vagy a DT_{50} értékét pontosabban is meg kell határozni. A felezési idő, illetve a DT_{50} értékét (konfidenciahatárokkal együtt) minden pH-értékre és hőmérsékletre meg kell adni, és ismertetni kell a felhasznált modellt, a kinetikai rendet és a korrelációs együtthatót (r^2). Ha vannak, a számításokat a hidrolízistermékekre is el kell végezni.

Ha a sebességértékek különböző hőmérsékleteken elvégzett vizsgálatokból származnak, akkor a hidrolízis pszeudo-elsőrendű reakciósebességi állandóját (k_{obs}) a hőmérséklet függvényében kell leírni. A számítást a k_{obs} savas katalizált, közömbös és lúgos katalizált hidrolízishez tartozó sebességi állandókra (rendre k_H, $k_{neutral}$, és k_{OH}) történő bontásával, az Arrhenius-egyenlet alapján kell elvégezni:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

ahol A_i és B_i a kelvinben megadott T abszolút hőmérséklet reciproka függvényében ábrázolt ln k_i értékekre lineáris regresszióval fektetett egyenesek regressziós állandói (metszete, illetve meredeksége). Az Arrhenius-összefüggést a savas katalizált, a közömbös és a lúgos katalizált hidrolízisre alkalmazva a pszeudo-elsőrendű reakciósebességi állandók, és így a felezési idők olyan hőmérsékletekre is előállíthatók, amelyek esetében nincs mód a reakciósebességi állandó közvetlen kísérleti meghatározására (10).

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

A legtöbb hidrolízisreakció jó közelítéssel elsőrendű folyamat, tehát a felezési idő független a koncentrációtól (lásd a 2. függelék 4. egyenletét). Ez rendszerint lehetőséget ad arra, hogy a laboratóriumban 10^{-2}-től 100^{-3} M nagyságrendű koncentrációval nyert eredményekből következtessünk a környezetben előforduló értékekre (ahol a koncentrációk 10^{-6} vagy az alatti nagyságrendűek) (10). Mabey és Mill (11) több olyan esetről is beszámolt, amikor különböző vegyi anyagok esetében megfelelő egyezést tapasztaltak a hidrolízis tiszta és természetes vizekben mért reakciósebessége tekintetében, feltéve hogy mind a pH-értéket, mind a hőmérsékletet mérték.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek legalább a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

— közhasználatú név, kémiai név, CAS-szám, szerkezeti képlet (radioaktívan jelölt anyag esetén a jelzés helyének feltüntetésével) és a releváns fizikai-kémiai tulajdonságok (lásd az 1.5. szakaszt),

— a vizsgált anyag tisztasága (szennyeződések),

— a jelölt vegyi anyag tisztasága és moláris aktivitása (ha szükséges).

▼B

— Pufferoldatok:

— a készítés dátuma és részletes adatai,

— alkalmazott puffer és víz,

— a pufferoldatok molaritása és pH-ja.

A vizsgálat körülményei:

— a vizsgálatok elvégzésének napja és a végrehajtás módja,

— a bevitt vizsgált anyag mennyisége,

— a vizsgált anyag bevitelének módszere, az oldószerek (típus és mennyiség),

— a vizsgált anyag inkubált pufferolt oldatainak térfogata,

— az alkalmazott inkubációs rendszer leírása,

— pH és hőmérséklet a vizsgálat alatt,

— mintavételi időpontok,

— az extrakció módszere(i),

— a pufferoldatokban lévő vizsgált anyag és hidrolízistermékek mennyiségének és mibenlétének meghatározására alkalmazott módszerek,

— a párhuzamos minták száma.

Eredmények:

— az alkalmazott analitikai módszer megismételhetősége és érzékenysége,

— a visszanyert mennyiségek (a vizsgálat érvényességéhez szükséges százalékértékeket az 1.7.1. szakasz adja meg),

— a párhuzamos minták adatai és átlaguk táblázatos formában,

— tömegmérleg a vizsgálatok alatt és végén (jelölt vizsgált anyag esetén),

— az elővizsgálat eredményei,

— az eredmények szöveges elemzése és értelmezése,

— valamennyi eredeti adat és ábra.

A következő információkat csak akkor kell megadni, ha a hidrolízis sebességét is meghatározzuk:

— a vizsgált anyag koncentrációinak ábrázolása az idő függvényében, és ha van, a vizsgált hidrolízistermékek ábrázolása minden pH-értéken és hőmérsékleten,

— a 20 °C/25 °C hőmérsékletre vonatkozó Arrhenius-egyenlet eredményei táblázatban összefoglalva, a pH, a reakciósebességi állandó [tf^{-1} vagy nap^{-1}], a felezési idő vagy a DT_{50}-érték, a hőmérsékletek [°C], továbbá mindezen adatok konfidenciahatárai és korrelációs együtthatói (r^2) vagy más hasonló adatai,

— a hidrolízis vélt folyamata.

▼B

4. **HIVATKOZÁSOK**

(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) Európai Unió (EU) (1995). A Bizottság 95/36/EK irányelve a növényvédő szerek forgalomba hozataláról szóló 91/414/EGK tanácsi irányelv módosításáról. 5. melléklet: A hatóanyag sorsa és viselkedése a környezetben.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr. 23.

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994–2000): Addenda 6–11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

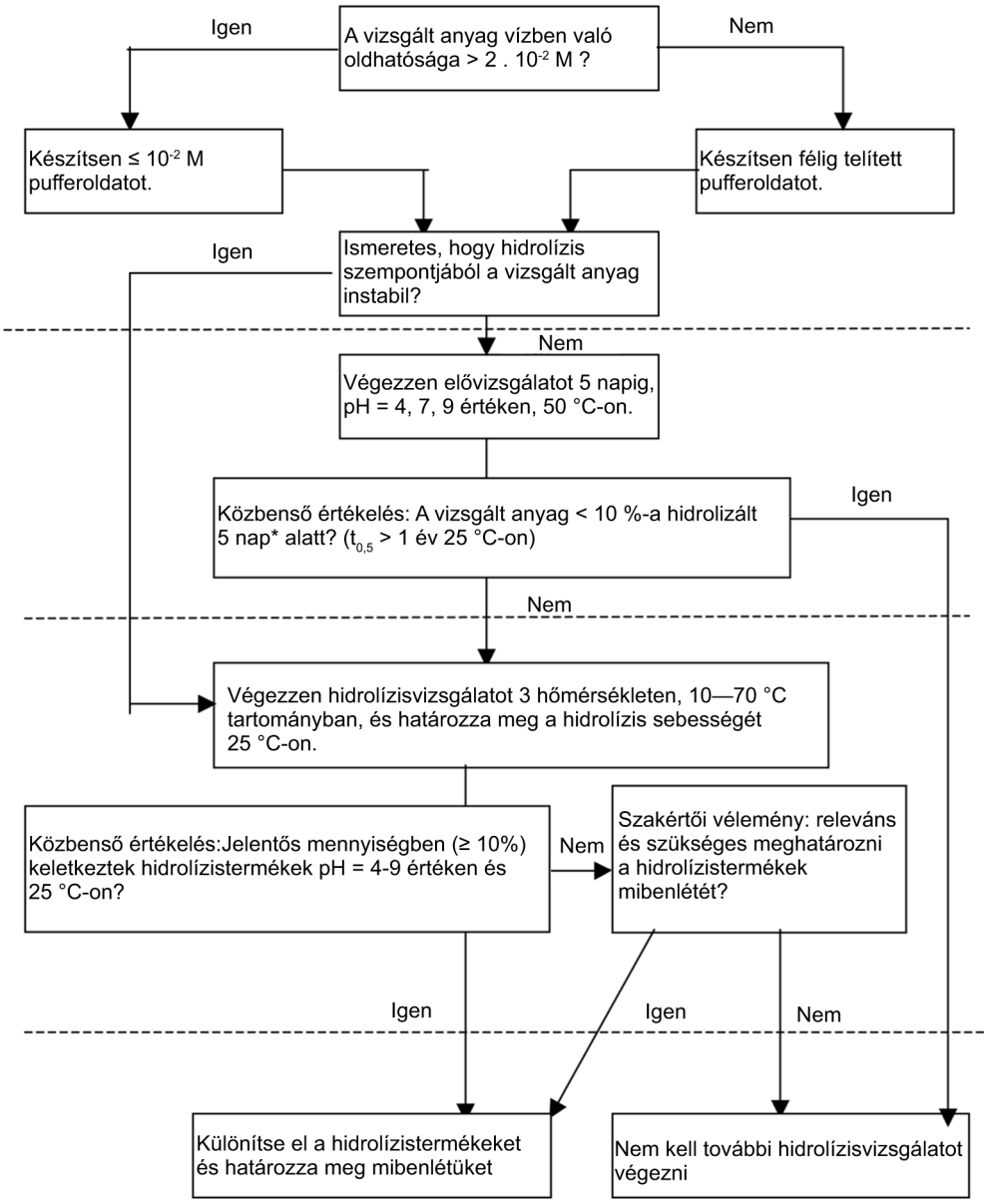
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997). Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

1. függelék

A hidrolízisvizsgálat többfokozatú rendszere



* A vizsgált anyag 10 %-os hidrolízise 50 °C-on kb. 30 nap, 25 °C-on kb. 1 év felezési időnek felel meg.

▼B

2. függelék

Fogalommeghatározások és mértékegységek

Minden esetben **szabványos nemzetközi (SI-) mértékegységet** kell használni.

Vizsgált anyag: tetszőleges anyag, legyen szó kiindulási anyagról vagy átalakulási termékről.

Átalakulási termék: a vizsgált anyag biotikus vagy abiotikus átalakulási reakciói eredményeképpen létrejött anyag.

Hidrolízistermék: a vizsgált anyag hidrolitikus reakciói eredményeképpen létrejött anyag.

Hidrolízis: valamely RX vizsgált anyag reakciója vízzel, amelynek során a hangsúly az OH-val helvettesítődő X csoport összmennyiségén van:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Az RX koncentrációjának csökkenési sebességét a következő összefüggés adja meg:

sebesség = $k\ [H_2O]\ [RX]$ másodrendű reakció

vagy

sebesség = $k\ [RX]$ elsőrendű reakció,

a reakciósebességet megszabó részreakciótól függően. Mivel a víz jóval nagyobb arányban van jelen, mint a vizsgált anyag, az ilyen típusú reakciót rendszerint pszeudo-elsőrendű reakciónak tekintjük, amelynek tapasztalati reakciósebességi állandóját a következő összefüggés adja:

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

A reakciósebességi együttható a következő összefüggésből határozható meg (*):

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

ahol

t = az idő;

C_o, C_t pedig = az RX koncentrációja a nulladik, illetve a t időpontban.

Az együttható dimenziója $(\text{idő})^{-1}$, a reakció felezési idejét (az RX 50 %-ának reakciójához szükséges időt) pedig a következő összefüggés adja meg:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Felezési idő ($t_{0,5}$): a vizsgált anyag 50 %-os hidrolíziséhez szükséges idő, ha a reakció folyamata elsőrendű kinetikával leírható. A felezési idő független a koncentrációtól.

(*) Ha a logaritmikus léptékben az idő függvényében ábrázolt adatok nem lineáris függvényt (azaz nem elsőrendű folyamatot) mutatnak, akkor a [3] képlet nem alkalmas a vizsgált vegyület hidrolízisét leíró reakciósebességi együttható meghatározására.

▼B

DT_{50} (50 %-os lebomlási idő): az az idő, amelyen belül a vizsgált anyag koncentrációja 50 %-kal lecsökken; ha a reakció folyamata nem elsőrendű kinetikát követ, akkor ez a mennyiség nem azonos a $t_{0,5}$ felezési idővel.

k becslése különböző hőmérsékleteken

Ha két hőmérsékleten ismerjük a reakciósebességi állandót, akkor az egyéb hőmérsékletekhez tartozó reakciósebességi állandó az Arrhenius-egyenletből számítható:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ vagy } \ln\ k = \frac{-\mathrm{E}}{R \times T} + \ln\ A$$

Az l/T függvényében ábrázolt In k értékek –E/R meredekségű egyenest adnak.

Az előző képletben:

k = a különböző hőmérsékleteken mért reakciósebességi állandó;

E = az aktiválási energia [kJ/mol];

T = az abszolút hőmérséklet [K];

R = a gázállandó [8,314 J/mol.K].

Az aktiválási energiát regresszióanalízissel vagy a következő egyenlettel számítjuk:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

ahol $T_2 > T_1$.

▼B

3. függelék

Pufferrendszerek

CLARK ÉS LUBS:

CLARK- és LUBS-féle pufferkeverékek (*)

Összetétel	pH
0,2 N HCl és 0,2 N KCl 20 °C-on	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl 100 ml-ig hígítva	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl 100 ml-ig hígítva	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl 100 ml-ig hígítva	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl 100 ml-ig hígítva	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl 100 ml-ig hígítva	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl 100 ml-ig hígítva	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl 100 ml-ig hígítva	2,2
0,1 M kálium-ftalát + 0,1 N HCl 20 °C-on	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	3,8
0,1 M kálium-ftalát + 0,1 N NaOH 20 °C-on	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	4,8

(*) A táblázatokban szereplő pH-értékek a Sörensen-féle normálegyenletek (1909) felhasználásával, potenciálmérésekből kerültek meghatározásra. A megfelelő pH-értékek 0,04-dal nagyobbak a táblázatban található értékeknél.

▼B

Összetétel	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	6,0

CLARK- és LUBS-féle pufferkeverékek (folytatás)

0,1 M monokálium-foszfát + 0,1 N NaOH 20 °C-on	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	8,0
0,1 M $H_3BO_3$0,1 M KCl-ban + 0,1 N NaOH 20 °C-on	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	10,0

B. **KOLTHOFF ÉS VLEESCHHOUWER:**

KOLTHOFF és VLEESCHHOUWER-féle citrátpufferek

Összetétel	pH
0,1 M monokálium-citrát és 0,1 N HCl 18 °C-on (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	3,6
0,1 M monokálium-citrát es 0,1 N NaOH 18 °C-on (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	6,0

(*) A penészképződés megakadályozása érdekében adjunk az elegyhez egy kisméretű timolkristályt vagy hasonló anyagot.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

SÖRENSEN-féle boraxkeverékek

Összetétel 1		Sörensen 18 °C	Walbum, pH a következő hőmérsékleten H a következő h hőmérsékleten		
ml borax	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M borax + 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 borax + 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

SÖRENSEN-féle foszfátkeverékek

Összetetel	pH
0,0667 M monokálium-foszfát + 0,0667 M dinátrium-foszfát 20 °C-on	
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. TOXICITÁS FÖLDIGILISZTÁKRA

MESTERSÉGES TALAJBAN VÉGZETT VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

A szóban forgó laboratóriumi vizsgálatban a vizsgált anyagot olyan mesterséges talajhoz adják hozzá, amelyben 14 napra földigilisztákat helyeznek el. Ezt az időszakot követően (másik lehetőségként hét nap elteltével) megvizsgálják az anyagnak a földigilisztákra gyakorolt letális hatását. A módszer a vegyi anyagnak a földigilisztákra a bőrükön keresztül, illetve a tápcsatornából történő felszívódás következtében gyakorolt hatásának viszonylag gyors kiszűrését teszi lehetővé.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁS ÉS MÉRTÉKEGYSÉG

LC_{50}: Az anyagnak az a koncentrációja, amely a vizsgálati időszak alatt a kísérleti állatok 50 %-át pusztítja el.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Rendszeres időközönként referenciaanyagot kell használni annak igazolására, hogy a vizsgálati rendszer érzékenysége nem változott-e jelentős mértékben.

Referenciaanyagként analitikai tisztaságú klór-acetamidot ajánlunk.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A talaj változó közeg, ezért a vizsgálathoz gondosan összeállított, mesterséges vályogtalajt kell használni. A vizsgált anyag különféle koncentrációival kezelt mesterséges talajban az *Eisenia foetida* (lásd a függelék megjegyzését) fajhoz tartozó felnőtt példányokat tartanak. A tárolóedények tartalmát a vizsgálat megkezdése után 14 nappal (és választhatóan hét nap elteltével) szétterítik egy tálcán, majd megszámolják az egyes koncentrációk mellett életben maradt földigilisztákat.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A vizsgálatot úgy kell megtervezni, hogy az a vizsgált talaj és szervezet tekintetében minél jobban ismételhető legyen. A kontrollcsoportban az elhullási arány nem haladhatja meg a 10 %-ot, különben a vizsgálat nem értékelhető.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. *Anyagok*

1.6.1.1. Vizsgált talaj

Meghatározott összetételű mesterséges talajt kell használni.

a) Alapszubsztrátum (a száraz tömeg százalékában)

— 10 % tőzegmoha (Sphagnum) (a pH 5,5 és 6,0 közötti értékhez a lehető legközelebb, úgy, hogy ne maradjon benne látható növénymaradvány, finomra őrölve),

▼B

— 20 % kaolinitagyag, lehetőleg 50 %-nál több kaolinittel,

— körülbelül 69 % ipari kvarchomok (domináns mennyiségű finom homok, több mint 50 %-ban 0,05 és 0,2 mm közötti szemcsenagysággal). Ha az anyag vízben nem oszlatható el eléggé, edényenként 10 g homokot tartalékban kell tartani, hogy később hozzáadhassák a vizsgált szubsztrátumhoz,

— mintegy 1 % vegytiszta, porított kalcium-karbonát ($CaCO_3$) hozzáadásával a pH-t 6,0 ± 0,5-re állítják be.

b) Vizsgált szubsztrátum

A vizsgált szubsztrátum az alapszubsztrátumot, a vizsgált anyagot és az ionmentesített vizet tartalmazza.

Víztartalmának az alapszubsztrátum száraz tömegének 25 és 42 %-a közé kell esnie. A szubsztrátum víztartalmának meghatározásához a mintát 105 °C-on állandó tömegig kell szárítani. A legfontosabb feltétel az, hogy a mesterséges talajt át kell nedvesíteni, de nem szabad azon víznek állni. Ügyelnünk kell rá, hogy a vizsgált anyagot és a vizsgált szubsztrátumot egyenletesen keverjük el egymással. A vizsgálati jelentésben fel kell jegyezni, hogyan vittük bele a vizsgált anyagot a szubsztrátumba.

c) Kontroll szubsztrátum

A kontroll szubsztrátum az alapszubsztrátumból és vízből áll. Ha bármely más adalékanyagot alkalmazunk, kiegészítő kontrollt is kell használni, amelyben az adott adalékanyagból ugyanannyi található.

1.6.1.2. Vizsgálati edények

Körülbelül egy liter űrtartalmú (szellőzőlyukakkal ellátott, műanyag fedővel, kupakkal vagy műanyag fóliával lefedett) üvegedények a szubsztrátum 500 g szárazanyag-tartalmának megfelelő mennyiségben a nedves vizsgált talajjal, illetve a kontrolltalajjal feltöltve.

1.6.2. *körülmények*

Az edényeket 20 ± 2 °C hőmérsékletű klímakamrában kell tartani folyamatos megvilágítás mellett. A fény intenzitásának 400 és 800 lux között kell lennie.

A vizsgálat időtartama 14 nap, de a mortalitást meg lehet vizsgálni a vizsgálat megkezdését követő hetedik napon is.

1.6.3. *A kísérlet végrehajtása*

Vizsgált koncentrációk

A vizsgált anyag koncentrációit az alapszubsztrátum száraz tömegéhez viszonyított tömegként adják meg (mg/kg).

Dózisbehatároló vizsgálat

Azon koncentrációtartományok, amelyek 0 és 100 % közötti mortalitást váltanak ki, előzetes vizsgálattal azonosíthatók azzal a céllal, hogy tájékozódjanak a részletes meghatározó vizsgálatban alkalmazható koncentrációtartományokról.

▼B

Az anyagot a következő koncentrációkban lehet vizsgálni: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg anyag/kilogramm vizsgált talaj (száraz tömeg).

Ha teljes körű meghatározó vizsgálatot akarunk végezni, az előzetes, dózisbehatároló vizsgálatban minden koncentrációra és a kezeletlen kontrollra elegendő egy-egy, 10 gilisztát tartalmazó vizsgálati csoport.

Meghatározó vizsgálat

Az előzetes, dózisbehatároló vizsgálat eredményeit arra használják fel, hogy a 0 és 100 % közötti mortalitási tartományban egy legalább öt koncentrációból álló mértani sort jelöljenek ki, amelyben az állandó szorzótényező legfeljebb 1,8.

Ezen vizsgálati sorral végzett vizsgálatok lehetővé teszik az LC_{50}-érték, illetve a konfidenciaszint lehető legpontosabb meghatározását.

A meghatározó vizsgálat során koncentrációnként legalább négy kísérleti csoportot és négy kezeletlen kontrollt kell használni, amelyek mindegyike 10-10 gilisztát tartalmaz. Ezen ismétlések eredményei adják az átlagértékeket és a normál szórást.

Ha két egymást követő és egymástól az 1,8-as faktort meghaladó mértékben nem különböző koncentráció csak 0 %-os és 100 %-os mortalitást ad, ezen értékek már elegendőek annak jelzésére, hogy az LC_{50} melyik tartományba esik.

Az alapszubsztrátum és a vizsgált talaj keveréke

A vizsgált talajt lehetőleg minden más szer hozzáadása nélkül, csak vízzel kell összeállítani. Közvetlenül a vizsgálat megkezdése előtt a vizsgált anyag ionmentesített vízben vagy egyéb oldószerben elkészített diszperzióját, illetve emulzióját elkeverik az alapszubsztrátummal, illetve finom kromatográfiás vagy ehhez hasonló szórókészülékkel egyenletesen eloszlatják az alapszubsztrátum felületén.

Ha a vizsgált anyag nem oldódik vízben, a lehető legkisebb mennyiségű megfelelő szerves oldószerben is feloldható (például hexánban, acetonban vagy kloroformban).

A vizsgált anyag oldatba vitelére, diszpergálására vagy emulgeálására csak könnyen illó oldószer használható. A vizsgált talajt a felhasználás előtt át kell szellőztetni. Az elpárolgott vízmennyiséget pótolni kell. A kontrollhoz bármely adalékanyagból azonos mennyiséget kell adni.

Ha a vizsgált anyag szerves oldószerekben egyáltalán nem oldódik, nem diszpergálható, és nem emulgeálható, finomra őrölt kvarchomok és a vizsgált anyag 500 g száraz tömegű mesterséges talaj kezelésére elegendő mennyiségének keverékéből 10 g-ot kell elkeverni 490 g száraz tömegű vizsgált talajjal.

Minden kísérleti csoportban 500 g száraz tömegnek megfelelő mennyiségű nedves vizsgált talajt helyeznek el, üvegedényenként 10 db gilisztával, amelyeket előzőleg hasonló nedves környezetben szoktattak 24 órán keresztül, majd gyorsan megmosták azokat, a felesleges vizet szűrőpapírral felszívatták, és a gilisztákat a szubsztrátum felületére helyezték.

▼B

A tárolóedényeket perforált műanyag fedővel, kupakkal vagy fóliával zárják le, hogy a talajt megóvják a kiszáradástól, majd 14 napon keresztül tartják a vizsgálati körülmények között.

Az értékelést a vizsgálat megkezdését követő 14. napon (és esetleg a 7. napon) lehet elvégezni. A talajt üveg- vagy rozsdamentes acéllemezen terítik szét. A gilisztákat megvizsgálják, és megállapítják a vizsgálatot túlélők számát. Az a giliszta tekinthető élettelennek, amely az elülső végét érő enyhe mechanikai ingerre nem reagál.

Ha a hetedik napon végeznek vizsgálatot, a tartályba visszatöltik a talajt, és a túlélő gilisztákat ugyanarra a vizsgálati talaj felületre helyezik vissza.

1.6.4. *Vizsgált organizmusok*

Vizsgált organizmusok: felnőtt *Eisenia foetida* példányok (lásd a függelék megjegyzését) (legalább két hónaposak, amelyeknél a clitellum [nyereg] már kialakult), 300 és 600 mg közötti nedves súllyal. (A tenyésztési módszereket lásd a függelékben.)

2. **ADATOK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

A vizsgált anyag koncentrációit rögzítik, mellettük megadva az egyes koncentrációkhoz tartozó elhullott gilisztáks számát százalékban.

Ha elegendő adat áll rendelkezésre, a szabványmódszerrel meg kell határozni az LC_{50}-értéket és a konfidencia-határértékeket ($p = 0,05$) (ezzel egyenértékű módszer Litchfield és Wilcox on, 1949). A vizsgált anyag LC_{50}-értékét milligrammban kell megadni a vizsgált talaj kilogrammjára (száraz tömeg) vonatkoztatva.

Azon esetekben, amikor a koncentrációs görbe túlságosan meredek az LC_{50} kiszámításához, ezen érték grafikus becslése is elegendő.

Ha két egymást követő és egymástól az 1,8-as szorzótényezőnél nagyobb mértékben nem különböző koncentráció csak 0 %-os és 100 %-os elhullást ad, ezen értékek már elegendőek annak jelzésére, hogy az LC_{50} melyik tartományba esik.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— nyilatkozat arról, hogy a vizsgálatot a fent említett minőségi követelményeknek megfelelően végezték,

— az elvégzett vizsgálatok (előzetes, dózisbehatároló vizsgálat és/vagy meghatározó vizsgálat),

— a vizsgálati körülmények pontos leírása, illetve nyilatkozat arról, hogy a vizsgálatot a módszernek megfelelően végezték-e el; minden eltérést jelezni kell,

— annak pontos leírása, hogy a vizsgált anyagot hogyan keverték bele a vizsgált talajba,

— a felhasznált vizsgált organizmusokkal kapcsolatos információk (faj, kor, súlyszélsőértékek és -átlag, tartási és tenyésztési körülmények, származás),

▼B

— az LC_{50} meghatározásához használt módszer,

— az összes felhasznált adatot tartalmazó vizsgálati eredmények,

— a vizsgált organizmusok viselkedésében megfigyelt tünetek vagy változások leírása,

— a kontrollok mortalitása,

— az LC_{50}, illetve a legmagasabb vizsgált koncentráció, amely a vizsgálat beindítását követő 14 nappal (és esetleg hét nappal) már elhullást nem eredményezett, és a legkisebb vizsgált koncentráció, amely ugyanezen időpontban már 100 %-os elhullást eredményezett,

— a koncentráció-hatás görbe felvétele,

— a referenciaanyaggal kapott eredmények, akár a mostani vizsgálatokkal kapcsolatosan, akár korábbi minőség-ellenőrzési próbán nyerték azokat.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 207. vizsgálati irányelv, a Tanács határozata, C(81) 30 végleges

(2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, Biology of Earthsworms, Chapman and Hall, London, p. 331.

(3) Bouche, M. B., 1972, Lombriciens de France, Écologie et Systématique, Institut National de la Recherche Agronomique, p. 671.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. J.Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, p. 99.

(5) Commission of the European Communities, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- and Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxisitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden”, in: Rudolph/Boje, Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Függelék

A giliszták tenyésztése és tartása a vizsgálat előtt

Az állatok tenyésztéséhez 30–50 darab felnőtt gilisztára van szükség, amelyeket friss szubsztrátummal ellátott tenyésztőládába helyeznek, majd 14 nap múlva eltávolítják azokat. Ezen állatokat használhatják fel a további tenyészetekhez. A gubóból kikelt giliszta felnőtt (ivarérett) korában használható fel a vizsgálatokhoz (a leírt feltételek mellett ez két-három hónap után következik be).

Tenyésztési és tartási körülmények

Klímakamra: 20 ± 2 °C hőmérséklet, lehetőleg folyamatos megvilágítással (400 és 800 lux közötti fényintenzitással).

Tenyésztő ládák: 10–20 liter űrtartalmú, megfelelően lapos edények.

Szubsztrátum: Az *Eisenia foetida* többféle állati ürüléken is tenyészthető. Tenyésztőközegként 50 térfogat-százalékos tőzeg és 50 térfogat-százalékos tehén vagy lótrágya keveréke ajánlott. A közeg pH-értéke körülbelül 6 és 7 között legyen (ezt kalcium-karbonáttal lehet szabályozni), és alacsony ionos vezetőképességgel kell rendelkeznie (6 mmhos-nál vagy 0,5 % sókoncentrációnál kevesebb).

A szubsztrátum legyen nedves, de ne legyen túl vizes.

A fent említett módszeren kívül még más sikeres módszer is alkalmazható.

Megjegyzés: Az *Eisenia foetida* két fajban létezik, amelyeket egyes taxonómusok külön alfajként írtak le (Bouche, 1972). Ezek morfológiailag nem különböznek, de egyikük, az *Eisenia foetida foetida* gyűrűin jellegzetes keresztirányú csíkozást vagy szalagokat találhatunk, amelyek a másikon, az *Eisenia foetida andrei* fajon nem jelennek meg, ellenben ennek vörösesebb színe van. Ha lehet, az *Eisenia foetida andrei* használatát javasoljuk. Más faj is használható, ha a hozzá szükséges módszertan rendelkezésre áll.

▼B

C.9. **BIOLÓGIAI LEBOMLÁS**

ZAHN–WELLENS VIZSGÁLAT

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

E módszernek az a célja, hogy felmérje a vízoldékony, nem illékony szerves anyagok végső biológiai lebontásának lehetőségeit akkor, ha statikus vizsgálati körülmények között viszonylag nagy töménységű mikroorganizmusnak vannak kitéve.

A szuszpendált szilárd részecskéken fizikokémiai adszorpció is létrejöhet, és ezt az eredmények értékelésekor figyelembe kell venni (lásd a 3.2. pontot).

A használni kívánt anyagokat 50 és 400 mg/liter közötti DOC-értékeknek, valamint 100 és 1 000 mg/liter közötti COD-értékeknek megfelelő koncentrációban vizsgáljuk (DOC = oldott szerves szén; COD = kémiai oxigénigény). E viszonylag magas koncentrációknak az az előnye, hogy analitikailag megbízhatóak. Mérgező tulajdonságú vegyületek késleltethetik vagy gátolhatják a lebomlás folyamatát.

E módszerben az oldott szerves szén vagy a kémiai oxigénigény mérését a vizsgált anyag végső biológiai lebonthatóságának felmérésére használjuk.

Az ezzel párhuzamosan alkalmazott analitikai módszer segíthet az anyag primer lebomlásának meghatározásában (a kiindulási molekulaszerkezet eltűnése).

A módszer csak olyan vizsgált szerves anyagra megfelelő, amely a vizsgálatban használt koncentrációban:

— a vizsgálati körülmények között vízben oldódik,

— páranyomása a vizsgálati körülmények között elhanyagolható,

— a baktériumokat nem gátolja,

— a vizsgálati rendszerben csak korlátozott mértékben szívódik fel,

— habképződés útján nem vész el a vizsgált oldatból.

A vizsgált anyag főbb összetevőinek egymáshoz viszonyított részarányának ismerete hasznos lehet a kapott eredmények értékeléséhez, különösen azon esetekben, amikor az eredmények (lebomlási értékek) alacsonyak vagy marginálisak.

Az anyag mikroorganizmusokra gyakorolt mérgező hatásának ismerete kívánatos az alacsony lebomlási értékek értékelésénél és a megfelelő vizsgált koncentrációk kiválasztásánál.

▼B

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A vizsgálat végén nyert lebomlási mértéket, mint a „Zahn–Wellens vizsgálatban kapott biológiai lebonthatóságot” kell értékelni,

$$D_t = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

ahol:

D_T = biológiai lebomlás (%) T idő alatt,

C_A = DOC- (vagy COD-) értékek a vizsgált keverékben a vizsgálat megkezdését követő három óra múlva (mg/l) (DOC = oldott szerves szén, COD = kémiai oxigénigény)

C_T = DOC- (vagy COD-) értékek a vizsgált keverékben mintavételkor (mg/l),

C_B = DOC- (vagy COD-) értékek a vakpróbában mintavételkor (mg/l),

C_{BA} = DOC- (vagy COD-) értékek a vakpróbában a vizsgálat megkezdését követő három óra múlva (mg/l)

A lebomlás mértékét a legközelebbi teljes százalékértékre kell kerekíteni.

A százalékos lebomlást a vizsgált anyag DOC- (vagy COD-) százalékának csökkenésével kell megadni.

A mért vagy számított kiindulási érték és a három óra elteltével mért érték közötti különbség hasznos információkkal szolgálhat az anyag megsemmisítésével kapcsolatban (lásd a 3.2. pontot, Az eredmények értelmezése).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Egyes esetekben, ha új anyagokat vizsgálunk, hasznos lehet a referenciaanyagok alkalmazása; konkrét referenciaanyagok ajánlása azonban egyelőre nem lehetséges.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Keverőszerkezettel és levegőztetőberendezéssel ellátott, négyliteres üvegedénybe élesztett iszapot, ásványi tápanyagokat és egyedüli szénforrásként a vizsgált anyagot helyeznek el a vizes oldatban. A keveréket kevertetik, levegőztetik, és 20 és 25 °C hőmérséklet között, diffúz megvilágításban vagy sötétkamrában tartják 28 napon keresztül. A lebomlási folyamatot a szűrt oldat DOC-, illetve COD-értékeinek naponkénti vagy egyéb megfelelő időközönként végzett meghatározása útján követik nyomon. Az indulást követő három óra elteltével mért érték és az egyes időközökben eltűnt DOC (vagy COD) mért értékeinek egymáshoz viszonyított arányát százalékos biológiai bomlás formájában fejezik ki, és ez szolgál a lebomlás adott időre számított mértékéül. Az eredményt az idő függvényében ábrázolva kapják meg a biológiai bomlás görbéjét.

Ha specifikus analitikai módszert használnak, mérhető a kiindulási molekula koncentrációjának a biológiai bomlás következtében előállott változása is (elsődleges biológiai bonthatóság).

▼B

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A vizsgálat kielégítő mértékű ismételhetőségét körvizsgálat bizonyította.

A módszer érzékenységét nagymértékben a vakpróba változékonysága és kisebb mértékben az oldott szerves szén, illetve a vizsgált vegyület folyadékkoncentrációjának kimutatási pontossága határozza meg.

1.6. A KÍSÉRLET VÉGREHAJTÁSA

1.6.1. *Előkészületek*

1.6.1.1. Reagensek

A vizsgálathoz használt víz: kevesebb mint 5 mg/liter szerves szenet tartalmazó ivóvíz. A kalcium- és magnéziumionok együttes koncentrációja nem haladhatja meg a 2,7 mmol/litert; ellenkező esetben ionmentesített vagy desztillált vízzel való hígításra van szükség.

Kénsav, analitikai reagens (A.R.):	50g/l
Nátrium-hidroxid-oldat A.R.:	40 g/l
Ásványitápanyag-oldat: oldjunk fel egy liter ionmentesített vízben:	
ammónium-kloridot, NH4Cl, A.R.:	38,5 g
nátrium-dihidrogen-foszfátot, NaH2PO4.2H2O, A.R.:	33,4 g,
kálium-dihidrogén-foszfátot, KH2PO4, A.R.:	8,5 g,
dikálium-monohidrogén-foszfátot, KH2PO4, A.R.:	21,75 g.

A keverék tápoldatként és pufferként egyaránt szolgál.

1.6.1.2. Készülékek

Egy és négy liter közötti űrtartalmú üvegedények (pl. üveghengerek).

Üveg- vagy fémlapáttal ellátott és megfelelő tengelyre szerelt keverőkészülék (a lapátnak az edény fenekétől 5–10 cm távolságra kell forognia). Helyette 7 és 10 cm közötti hosszúságú, rúddal felszerelt mágneses keverő is használható.

2 és 4 mm közti belső átmérőjű üvegcső a levegőztetésre. A cső nyílása az edény fenekétől kb. 1 cm-re legyen.

Centrifuga (kb. 3 550 g).

pH-mérő.

Oldottoxigénkoncentráció-mérő készülék.

Szűrőpapírok.

▼B

Membránszűrő készülék.

Membránszűrők 0,45 μm-es pórusokkal. A membránszűrők akkor felelnek meg a célnak, ha meggyőződtek róla, hogy sem szenet nem bocsátanak ki, sem pedig a vizsgált anyagot nem abszorbeálják a szűrés során.

A szervesszén-tartalom, illetve a kémiai oxigénigény meghatározására alkalmas analitikai berendezés.

1.6.1.3. Az inokulum előkészítése

A biológiai szennyvíztisztítóból származó aktivált szennyvíziszapot (ismételten) kimossák és centrifugálják, vagy azt a vizsgálathoz használt vízzel ülepítik (lásd fent).

Az aktivált iszapnak megfelelő állapotban kell lennie. Az ilyen iszap valamely megfelelően működő szennyvíztisztítóból könnyen beszerezhető. Annak érdekében, hogy a lehető legtöbb baktériumfajt, illetve baktériumtörzset szerezzék be, érdemes különböző forrásból származó inokulumokat összekeverni (pl. több szennyvíztisztítóból, különböző talajkivonatokat, folyókból származó vizet stb.). A keveréket a fentieknek megfelelően kell kezelni.

Az aktivált iszap aktivitásának ellenőrzését lásd az alábbiakban, a „Funkcionális ellenőrzés” című szakaszban.

1.6.1.4. A vizsgált oldat előkészítése

A vizsgálathoz használt edénybe 500 ml vizet, 2,5 ml/liter ásványi-anyag-tápoldatot és 0,2–1,0 g szárazanyag/liter végkoncentrációjú aktivált iszapot kell önteni. Hozzá kell adni megfelelő mennyiségű törzsoldatot a vizsgált anyagból úgy, hogy a végső keverékben a DOC-koncentráció 50 és 400 mg/liter között legyen. Az ennek megfelelő COD-értékek 100 és 1 000 mg/liter között változnak. A vizsgálathoz használt vízzel ki kell egészíteni összesen egy–négy literre. A mennyiség megválasztása a DOC- és COD-meghatározásokhoz veendő minták számától és az analízishez szükséges térfogattól függ.

Általában két liter elegendő. Legalább egy kontrolledényt (vakot) kell beállítani minden vizsgálati sorhoz; ebben csak aktivált iszap és ásványi tápoldat van, amelyet a vizsgálati edényekben lévő térfogattal megegyező térfogatra kell kiegészíteni.

1.6.2. *A kísérlet végrehajtása*

A vizsgálati edényeket mágneses vagy csavaros keverővel diffúz megvilágításban vagy egy sötét szobában 20 és 25 ^{o}C közötti hőmérsékleten kell kikeverni. A levegőztetést tisztítás céljából vattaszűrőn és szükség esetén mosópalackon keresztül fúvatott sűrített levegővel érik el. Biztosítani kell, hogy az iszap ne ülepedjen le, és az oxigénkoncentráció ne essen 2 mg/liter alá.

A pH-értéket rendszeres időközönként (pl. naponta) ellenőrizni kell, és szükség esetén be kell állítani 7 és 8 közé.

▼B

A párolgási veszteséget közvetlenül a mintavétel előtt ionmentesített vagy desztillált vízzel a megfelelő mennyiségben pótolni kell. Jó módszer, ha a folyadék szintjét a vizsgálatok megkezdése előtt jelöljük az edény falán. Minden mintavétel után új jelet tesznek (levegőztetés és keverés nélkül). Az első mintákat mindig a vizsgálat megkezdését követő három óra múlva veszik, hogy kiderítsék, felszívódott-e a vizsgált anyag az aktivált iszapba.

A vizsgált anyag eltűnését követően naponta vagy más rendszeres időközben végeznek DOC-vagy COD-meghatározást. A vizsgálati edényből és a vakpróbából származó mintákat gondosan átmosott szűrőpapíron átszűrik. Az oldat szűri etének első 5 ml-ét eldobják. A nehezen szűrhető iszapot előzetesen tízperces centrifugálással távolítják el. A DOC- és COD-meghatározásokat legalább két párhuzamos mintán el kell végezni. A vizsgálatot 28 napon át folytatják.

Megjegyzés: A továbbra is zavaros mintákat membránszűrőn szűrik át. A membránszűrő nem bocsáthat ki, és nem vehet fel szerves anyagokat.

Az aktivált iszap funkcionális ellenőrzése

Valamely ismert anyagot tartalmazó edényt is be kell állítani a vizsgálati sorba, hogy ellenőrizzék az aktivált iszap működőképességét. E célra a dietilén-glikol megfelelő.

Adaptáció

Ha az elemzéseket viszonylag rövid időközönként végzik (például naponta), az adaptáció a bomlási görbéből világosan felismerhető (lásd a 2. ábrát). Ezért nem célszerű a vizsgálatot közvetlenül a hétvége előtt megkezdeni.

Ha az adaptáció a vizsgálati időszak vége felé jelenik meg, a vizsgálatot meg lehet hosszabbítani, amíg a lebomlás be nem fejeződött.

Megjegyzés: Ha szükség van bővebb ismeretekre az adaptálódott iszap viselkedésével kapcsolatosan, ugyanazt az aktivált iszapot kell még egyszer ugyanazon vizsgált anyaggal kezelni, az alábbi eljárás szerint:

Kikapcsolják a keverőgépet és a szellőztető berendezést, majd hagyják, hogy az aktivált iszap leülepedjen. Leszívják a felülúszó folyadékot, vízzel feltöltik két literre, 15 percig keverik, majd hagyják, hogy ismét leülepedjen. Miután a felülúszót ismét leszívták, a visszamaradt iszapot arra használják, hogy a vizsgálatot ugyanazon anyaggal a fenti 1.6.1.4. és 1.6.2. pontnak megfelelően megismételjék. Az aktivált iszap ülepítés helyett centrifugálással is elkülöníthető.

Az adaptált iszapot friss iszappal is elkeverhetik literenként 0,2–1 g közötti száraz tömeg/liter koncentrációig.

▼B

Analitikai eszközök

A mintákat szokásos esetben gondosan átmosott szűrőpapíron szűrik meg (a mosáshoz ionmentesített vizet kell használni).

A továbbra is zavaros mintákat membránszűrőn is át kell szűrni (0,45 μm).

A DOC-koncentrációt a TOC-műszer segítségével két párhuzamos mintán határozzák meg a minták szűri eteiből (az első 5 ml-t kiöntik). Ha a szűrletet nem tudják ugyanazon a napon elemezni, azokat másnapig hűtőszekrényben kell tárolni. Ennél hosszabb tárolás nem ajánlott.

A COD-koncentráció meghatározását a minta szűrletéből a hivatkozott szakirodalomban másodikként feltüntetett dokumentumban ismertetett eljárás szerint végzik el.

2. **ADATOK ES ÉRTÉKELÉS**

A DOC- és/vagy COD-koncentrációkat legalább két párhuzamos mintán kell meghatározni a fentebb említett 1.6.2. pont szerint. A T időben fennálló bomlás mértékét a fentebb az 1.2. pontban ismertetett képlet alapján számolják ki.

A bomlás mértékét a legközelebbi egész százalékra kerekítik. A vizsgálat végén kapott bomlási értéket a jegyzőkönyvben „Biológiai lebonthatóság a Zahn-Wellens vizsgálat szerint” címen rögzítik.

Megjegyzés: Ha teljes bomlást észlelünk a vizsgálati idő lejárta előtt, és az eredményt a következő napon megismételt elemzés is megerősíti, a vizsgálatot le lehet zárni.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— az anyag kiindulási koncentrációja,

— minden egyéb információ és a vizsgált anyagra, a referenciaanyagra – ha volt –, valamint a vakpróbára vonatkozó vizsgálati eredmények,

— koncentráció három óra elteltével,

— biológiai bomlási görbe, leírással,

— dátum és helyszín, ahonnan a vizsgálati organizmusok mintáját vettük, adaptációs állapotuk, a felhasznált koncentráció stb.,

— a vizsgálati eljárásban történt bármely változtatás tudományos okai.

3.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A DOC (COD) eltűnése, amely fokozatosan, napok vagy hetek alatt játszódik le, azt jelzi, hogy a vizsgált anyag biológiai úton bomlik le.

▼B

Bizonyos esetekben azonban a fizikokémiai felszívódás is szerepet játszhat, amit az jelez, ha rögtön az első három órán belül teljesen vagy részben eltűnik az anyag, és a kontroll-, valamint a vizsgálati edényben mért felülúszó folyadék mennyisége közötti különbség jóval a várt szint alatt marad.

További vizsgálatokra van szükség, ha az adszorpciót és a tényleges (vagy részleges) biológiai bomlást szándékoznak elkülöníteni.

Számos lehetőség kínálkozik, de ezek közül a legmeggyőzőbb az, ha a felülúszót vagy az iszapot használják fel kiindulási törzsként (inokulum) egy alapvizsgálathoz (lehetőleg egy respirometriás vizsgálathoz).

Azon vizsgált anyagok, amelyek DOC- (COD-) értékei a szóban forgó vizsgálat során gyorsan és nem felszívódás útján csökkennek, biológiailag lebonthatónak tekinthetők. A részleges és nem felszívódás útján történő kiürülés azt jelzi, hogy a vegyület legalább részben bomlik biológiailag. Ha a DOC- (COD-) érték nem vagy csak alig csökken, annak oka lehet az is, hogy a vizsgált anyag gátolja a mikroorganizmusokat, amit az is jelezhet, hogy az iszap szétesik és elvész, zavaros felülúszót eredményezve. Ilyenkor a vizsgálatot a vizsgált anyag alacsonyabb koncentrációjával kell megismételni.

Vegyületspecifikus analitikai módszerek vagy a ^{14}C izotóppal jelölt vizsgált anyag használata nagyobb érzékenységet tesz lehetővé. Ha ^{14}C izotóppal jelölt vegyületet alkalmaznak, a biológiai bomlás tényét a $^{14}CO_2$ kinyerési aránya fogja megerősíteni.

Ha az eredményeket elsődleges biológiai bomlás formájában adják meg, lehetőség szerint magyarázatot kell adni a kémiai szerkezet olyan jellegű változását illetően, amely a kiindulási vegyület ismételt fellelésének hiányát okozza.

A vak vizsgálati közeg válaszreakciója mellett az analitikai módszer hitelesítését is meg kell adni.

4. HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM

(1) OECD, Párizs, 1981, 302. B. vizsgálati irányelv, a Tanács határozata, C(81) 30 végleges

(2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, A Bizottság 84/449/EGK irányelve (HL L 251., 1984.9.9., 1. o).

▼B

Függelék

ÉRTÉKELÉSI PÉLDA

Szerves vegyület:	4-etoxi-benzoesav
Elméleti vizsgálati koncentráció:	600 mg/l
Elméleti DOC-tartalom:	390 mg/l
Oltóanyag (inokulum)	szennyvíztisztító telep
Koncentráció:	1 gramm szárazanyag-tartalom/liter
Adaptációs állapot:	nincs adaptálva
Elemzés:	DOC-meghatározás
A minta mennyisége:	3 ml
Kontrollvegyület:	dietilén-glikol
A vegyület toxicitása:	1 000 mg/l alatt nincs toxikus hatás Használt vizsgálat: fermentációs kémcsőpróba

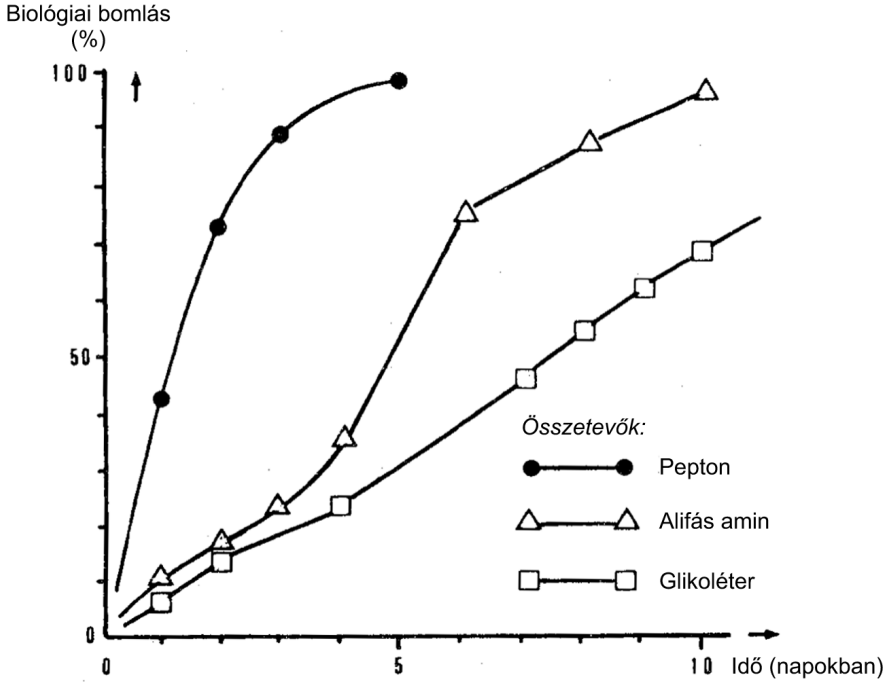
Vizsgálati idő	Kontrollanyag				Vizsgált anyag		
	Vak DOC (1) mg/l	DOC (1) mg/l	Nettó DOC mg/l	Bomlás %	DOC (1) Mg/l	Nettó DOC Mg/l	Bomlás %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 óra	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 nap	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 nap	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 nap	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 nap	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 nap	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 nap	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 nap	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 nap	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Három párhuzamus meghatározás átlagértéke.

▼B

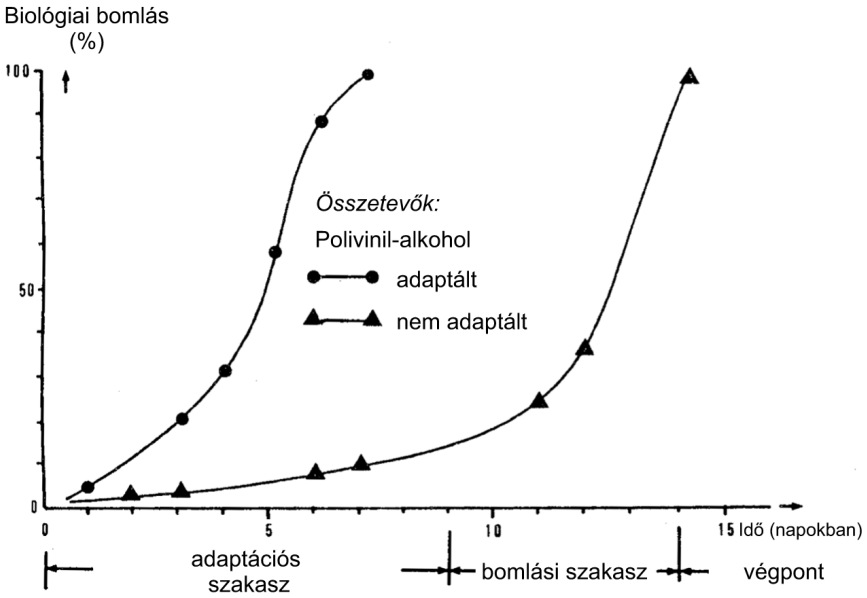
1. ábra

Biológiai bomlás görbéje (példa)



2. ábra

A szennyviziszap adaptálása (példa)



▼M4

C.10. **AEROB SZENNYVÍZTISZTÍTÁS-SZIMULÁCIÓS VIZSGÁLAT: C.10-A: ELEVENISZAPOS BERENDEZÉSEK – C.10-B: BIOFILMEK**

C.10-A: Eleveniszapos berendezések

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 303. vizsgálati iránymutatásában (2001) leírt módszerrel. Az 1950-es években felismerték, hogy az újonnan bevezetett felületaktív anyagok túlzott habképződést okoznak a szennyvíztisztító telepeken és a folyókban. Az aerob szennyvíztisztítás során ezeket az anyagokat nem lehetett teljes mértékben eltávolítani, és egyes esetekben más szerves anyagok eltávolítását is korlátozták. Számos kutatás indult annak felderítésére, hogy a felületaktív anyagok hogyan távolíthatók el a szennyvízből, illetve hogy az ipar által előállított új vegyi anyagok eltávolíthatók-e egyáltalán a szennyvíztisztítás során. Erre a célra az aerob biológiai szennyvíztisztítás két fő típusát (eleveniszapos és csepegtetőtestes szennyvíztisztítás) képviselő modellberendezéseket alkalmaztak. Gyakorlati szempontból – még helyi szinten is – célszerűtlen és nagyon költséges lett volna minden egyes új vegyi anyagot elkülönítve vizsgálni és nagyüzemi szennyvízkezelő telepeket megfigyelni.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

Eleveniszapos berendezések

2. Az eleveniszapos modellek mérete a leírások szerint 300 ml és kb. 2 000 ml között változott. Ezek között voltak olyanok, amelyek a valódi méretű szennyvíztisztító telepek mintájára készültek, azaz iszapülepítő tartállyal rendelkeztek, ahonnan a leülepedett iszapot visszapumpálták egy levegőztető edénybe, és olyanok is, ahol nem történt ülepítés (például Swisher (1)). A készülék méretét kettős követelmény szem előtt tartásával kellett meghatározni: egyrészt elég nagynak kellett lennie ahhoz, hogy mechanikai szempontból működőképes legyen, és kellő mennyiségű minta vételét tegye lehetővé anélkül, hogy ez a működést befolyásolná, másrészt viszont nem lehetett túlzottan hely- és anyagigényes.

3. Ez a vizsgálati módszer azt a két készüléktípust – a Husmann-berendezést (2) és a „lyukacsos edényt” (3)(4) – ismerteti, amelyeket széles körben és kielégítő módon alkalmaztak, első alkalommal a felületaktív anyagok kutatása során. Léteznek más modellek is, például az Eckenfelder (5), amelyek alkalmazása kielégítő eredményt adott. Mivel ez a szimulációs vizsgálat viszonylag drága és munkaigényes, egyidejűleg egyszerűbb és olcsóbb szűrővizsgálatok is szerepeltek a kutatásban, amelyek az e melléklet C.4. fejezetében szereplő A–F módszereknél (6) kerülnek bemutatásra. A nagy számú felületaktív anyaggal és más vegyi anyaggal végzett kísérlet azt mutatta, hogy azok az anyagok, amelyek a szűrővizsgálaton átmentek (biológiailag gyorsan lebonthatók), a szimulációs vizsgálat során is lebomlottak. Azok az anyagok, amelyek nem mentek át a szűrővizsgálaton, részben átmentek a jellegénél fogva biológiailag lebontható anyagok azonosítására szolgáló szűrővizsgálaton (e melléklet C.12. és C.19. fejezetei (7) (8)), ám ez utóbbi csoportból csak néhány bomlott le a szimulációs vizsgálat során, míg azok a vegyi anyagok, amelyek a jellegénél fogva biológiailag lebontható anyagok azonosítására szolgáló szűrővizsgálaton nem mentek át a (9)(10)(11) szimulációs vizsgálatok során sem bomlottak le.

4. Bizonyos célokra egyetlen üzemi feltételrendszer mellett végzett szimulációs vizsgálatok is elegendők; az eredmények kifejezésére a vizsgált vegyi anyag vagy az oldott szerves szén (DOC) százalékos eltávolítását használjuk. Ez a vizsgálati módszer egy ilyen vizsgálatot ismertet. A fejezet előző változatával szemben, amely mindössze egyetlen – mesterségesen készített szennyvizet használó, kapcsolt üzemmódban működő és viszonylag durva iszapelvételi módszert alkalmazó – készüléktípust ismertetett, a jelenlegi szöveg

▼M4

több változatot mutat be. A készülék típusára és üzemmódjára, valamint a szennyvízre és az iszapelvételre vonatkozóan egyaránt több alternatívát kínál. A szöveg szorosan igazodik az ISO 11733 szabvány (12) szövegéhez, amelyet az előkészítése során alapos vizsgálatnak vetettek alá, jóllehet a módszer nem képezte körvizsgálat tárgyát.

5. Más célokra pontosabban kell ismerni a vizsgált vegyi anyag koncentrációját a berendezés elfolyó vízében, amely egy alaposabb módszert igényel. Például, a vizsgálat időszaka alatt minden nap precízebben kell ellenőrizni az iszapelvétel arányát, és a berendezéseket különféle arányokkal kell működtetni. Ha egy mindenre kiterjedő módszerre van szükség, akkor mindezeken túl két vagy három eltérő hőmérsékletérték alkalmazásával kell a vizsgálatokat elvégezni: egy ilyen módszert ír le Birch (13)(14) és foglal össze a 6. függelék. A jelenleg rendelkezésre álló ismeretek azonban nem elégségesek annak eldöntéséhez, hogy a kinetikai modellek közül melyek alkalmasak a vegyi anyagok szennyvíztisztítás során és általában véve a vízi környezetben történő biológiai lebomlása mérésére. A 6. függelékben példaként ismertetett Monod-féle kinetikai modell alkalmazhatósága az 1 mg/l és annál nagyobb koncentrációban jelen lévő vegyi anyagokra korlátozódik, de egyes vélemények szerint még ez sem bizonyított. A szennyvízre jellemzőhöz közelebb álló koncentrációk mellett végzett vizsgálatokat ír le a 7. függelék, de a 6. függelékben bemutatottakhoz hasonlóan ezek is csak egy függelékben kerülnek megjelentetésre, nem pedig külön kiadott vizsgálati módszerként.

Szűrők

6. A csepegtetőtestes modellekre jóval kisebb figyelem irányult, melynek oka talán abban keresendő, hogy nehézkesebbek és nagyobb helyet foglalnak el, mint az eleveniszapos modellek. Gerike *et al.* kapcsolt üzemmódban működtetett csepegtetőtestes berendezéseket fejlesztett ki (15), amelyek viszonylag nagyméretűek (2 m magasak és 60 l térfogatúak) voltak, és minden egyes berendezés üzemeltetéséhez óránként 2 l szennyvízre volt szükség. Baumann et al (16) 1 méteres (14 mm belső átmérőjű) csövekbe helyezett gyapjúszerű poliészterszalagokat használt a csepegtetőtestes szennyvíztisztítás szimulálásához, amelyeket előzőleg 30 percig tömény eleveniszapban áztatott. A kizárólagos szénforrásként szolgáló vizsgált vegyi anyagot sóoldatban adagolták a függőlegesen elhelyezett csőbe, a biológiai lebonthatóságot a berendezés elfolyó vízének oldott szerves széntartalmának (DOC) és az eltávozó gáz széndioxid-tartalmának mérései alapján értékelték.

7. A bioszűrők szimulálására alkalmazott másik módszernél (15) a vizsgált vegyi anyagot tartalmazó illetve nem tartalmazó szennyvizet (kb. 250 ml/h) a vízszinteshez viszonyítva kis dőlésszögben elhelyezett forgó csövek belsejébe adagolták, majd elemezték a berendezés felfogott elfolyó vízének DOC és/vagy vizsgált vegyianyag-tartalmát.

A VIZSGÁLAT ELVE

8. E módszer célja a vízben oldható szerves vegyi anyagok aerob körülmények közötti, mikroorganizmusok által történő lebontásának és elsődleges, illetve teljes biológiai lebonthatóságának a meghatározása egy eleveniszapos folyamatot szimuláló, folyamatos üzemű vizsgálati elrendezésben. A mikroorganizmusok számára a vizsgált szerves vegyi anyag és egy biológiailag gyorsan lebontható szerves közeg jelentik a szén- és energiaforrást.

9. Két folyamatos üzemű vizsgálóberendezést (eleveniszapos szennyvíztisztítót vagy „lyukacsos edényt”) működtetünk azonos, a vizsgálat céljának megfelelően kiválasztott feltételek mellett. Az átlagos hidraulikus tartózkodási idő általában 6 óra, az átlagos iszapkor (iszaptartózkodási idő) 6–10 nap. A fölösiszap-elvétel két módszer egyikével történik; a vizsgált vegyi anyagot csak az egyik berendezésbe befolyó szennyvízhez (szerves közeghez) adagoljuk, általában úgy, hogy a szerves szén (DOC) koncentráció a 10 mg/l és 20 mg/l között legyen. A másik berendezést kontroll berendezésként használjuk a szerves közeg biológiai lebonthatósága meghatározására.

▼M4

10. Gyakori mintavétel segítségével meghatározzuk – lehetőség szerint – a berendezés elfolyó vízének DOC-koncentrációját vagy kémiai oxigénigényét (COD), valamint – szükség esetén – specifikus analízis segítségével a vizsgált vegyi anyag koncentrációját annak a berendezésnek az elfolyó vizében, amelybe a vizsgált vegyi anyagot adagoltuk. Feltételezzük, hogy a vizsgálati berendezés és a kontroll berendezés elfolyó vízében mért DOC-koncentrációk vagy COD értékek különbsége a vizsgált vegyi anyagnak vagy szerves metabolitjainak tulajdonítható. A vizsgált vegyi anyag lebomlásának meghatározásához ezt a különbséget összehasonlítjuk a befolyó szennyvíz vizsgált vegyi anyag hozzáadásának tulajdonítható DOC-koncentrációjával vagy COD értékével.

11. A lebomlást az idő függvényében ábrázoló görbe alapos vizsgálata általában lehetővé teszi a biológiai lebontás biológiai adszorpciótól való megkülönböztetését, megerősítése pedig általában a gyors biológiai lebonthatóság megállapítására szolgáló vizsgálat segítségével lehetséges, amelyhez abból a berendezésből gyűjtött akklimatizált oltóanyagot kell használni, amelybe a vizsgált vegyi anyagot adagoltuk.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

12. Az eredmények helyes értelmezéséhez ismerni kell a vizsgált vegyi anyag tisztasági, vízoldékonysági, illékonysági és adszorpciós jellemzőit. Illékony és oldhatatlan vegyi anyagok általában csak különleges óvintézkedések megtétele esetén vizsgálhatók (lásd az 5. függeléket). Az elméleti értékek kiszámításához, illetve a paraméterek mért értékeinek ellenőrzéséhez (például elméleti oxigénigény (ThOD), oldott szerves szén (DOC) és kémiai oxigénigény (COD)) a kémiai szerkezet vagy legalább a tapasztalati képlet ismerete is szükséges.

13. A vizsgált vegyi anyag mikroorganizmusokra gyakorolt toxikus hatására vonatkozó információk (lásd a 4. függeléket) hasznosak lehetnek a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásánál és különösen fontosak lehetnek az alacsony biológiai lebomlási értékek helyes értelmezéséhez.

MEGFELELÉSI SZINTEK

14. A felületaktív anyagok elsődleges biológiai lebonthatósága szimulációs (igazoló) vizsgálatának eredeti követelményei szerint a meghatározott vegyi anyagnak legalább 80 %-os eltávolítási szintet kellett elérnie ahhoz, hogy a felületaktív anyag forgalmazható legyen. 80 % alatti érték esetén a felületaktív anyag csak akkor forgalmazható, ha az itt bemutatott szimulációs (igazoló) vizsgálat alkalmazása során a meghatározott vegyi anyag több mint 90 %-a eltávolítható. A vegyi anyagok többségénél a megfelelési szint általában nem vet fel kérdéseket, az eltávolítás százalékos értéke pedig felhasználható a vegyi anyagok veszélyességének értékelése során alkalmazandó várható környezeti koncentráció közelítő becsléséhez. A vizsgálatok általában „mindent vagy semmit” eredményt hoznak. Számos vizsgálatban a tiszta vegyületek több mint háromnegyede 90 % feletti százalékos DOC-eltávolítást mutatott, a jelentősebb fokú biológiai lebonthatóságot mutató vegyületek több mint 90 %-a pedig 80 % feletti eredményt ért el.

15. Az itt bemutatott vizsgálathoz használt (10 mg C/l körüli) koncentrációban viszonylag kevés vegyi anyag van jelen a szennyvízben (például felületaktív anyagok). Egyes vegyi anyagok esetében ez gátló koncentráció lehet, míg más estekben az alacsony koncentráció megváltoztatja az eltávolítás kinetikáját. A lebomlás pontosabb értékelése a módszerek módosításával, a vizsgált vegyi anyag valóságosnak megfelelő, alacsony koncentrációban történő használatával, majd a kapott adatokból számítható kinetikai állandók meghatározásával lehetséges. Az ehhez szükséges kísérleti módszerek teljes körű validálása, illetve a biológiai bomlási reakciókat leíró kinetikai modellek kidolgozása azonban még nem történt meg (lásd 7. függelék).

▼M4

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

16. A kísérleti eljárás helyes végrehajtásának biztosítása érdekében időnként ajánlott ismert viselkedésű vegyi anyagokat is vizsgálni a vizsgált anyaggal egyidejűleg. Ezek közé tartozik például az adipinsav, a 2-fenilfenol, az 1-naftol, a difénsav, az 1-naftoesav, stb. (9)(10)(11).

A VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK MEGISMÉTELHETŐSÉGE

17. A szimulációs vizsgálatok szakirodalma jóval szegényesebb, mint a gyors biológiai lebonthatóságra vonatkozó vizsgálatoké. A legalább 80 %-ban lebomló vegyi anyagoknál az (egyidejű) ismétlések jó reprodukálhatósági értéket mutatnak (10–15 %-on belül), a nehezebben lebomló vegyi anyagok esetén azonban nagyobb a variabilitás. Emellett néhány határesetnek minősülő vegyi anyag esetében nagyon eltérő eredmények kerültek feljegyzésre a vizsgálat 9 hetes megengedett időtartama alatt a különböző időpontokban (például 10 %, 90 %).

18. A kétféle készüléktípus alkalmazásával kapott eredmények között kicsi az eltérés, de egyes vegyi anyagok lebomlása nagyobb mértékben és következetesebben volt megfigyelhető a háztartási szennyvízben, mint az OECD iránymutatása szerinti, mesterségesen készített szennyvízben.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

Vizsgálati elrendezés

19. A vizsgálati elrendezés minden egyes vizsgált vegyi anyag esetén egy vizsgálati berendezésből és egy kontroll berendezésből áll; ha csak specifikus analízis (elsődleges biológiai lebonthatóság meghatározása) elvégzésére kerül sor, akkor azonban egy vizsgálati berendezés is elegendő. Egy kontroll berendezés ugyanazon vegyi anyag vagy különböző vegyi anyagok vizsgálatához használt több vizsgálati berendezéshez is tartozhat. Kapcsolt berendezések alkalmazása (3. függelék) esetén mindegyik vizsgálati berendezéshez külön kontroll berendezést kell biztosítani. A vizsgálati elrendezés kétféle lehet: eleveniszapos szennyvíztisztítót modellező Husmann-berendezés (1. függelék, 1. ábra) vagy „lyukacsos edény” (1. függelék, 2. ábra). Mindkét esetben szükség van a befolyó szennyvíz és az elfolyó víz tárolására szolgáló megfelelő méretű tartályokra, valamint adagolópumpákra, amelyek keverve vagy külön-külön adagolják a befolyó szennyvizet és a vizsgált vegyi anyag oldatát.

20. Mindegyik eleveniszapos berendezésnek rendelkeznie kell egy ismert térfogatú, körülbelül 3 liter eleveniszap befogadására alkalmas levegőztető edénnyel és egy körülbelül 1,5 liter térfogatú szeparátorral (másodlagos tisztítás céljára); a térfogat a szeparátor magasságának változtatásával bizonyos mértékig módosítható. Eltérő méretű edények alkalmazása a hidraulikus terhelés megfelelő módosítása esetén megengedett. Ha a vizsgálati helyiségben nem biztosítható a kívánatos tartományon belüli hőmérséklet, akkor ajánlott szabályozott hőfokú vízköpennyel körülvett edényeket használni. A szeparátorból kikerülő eleveniszapot légpumpa vagy adagoló szivattyú segítségével folyamatosan vagy egyenlő hosszúságú szüneteket tartva szakaszosan vezetjük vissza a levegőztető edénybe.

21. A „lyukacsos edény” elrendezés egy porózus falú, kúpos aljú hengeres belső tartályból és egy azt körülfogó, valamivel nagyobb, ugyanolyan alakú vízzáró műanyag edényből áll. A lyukacsos tartály elkészítésére alkalmas anyag a 90 μm legnagyobb pórusátmérőjű, 2 mm vastag porózus polietilén. Az iszap és a tisztított szerves közeg szétválasztása azon alapul, hogy a két anyag különbözőképpen halad át a lyukacsos falon. A kilépő termék a gyűrű alakú részen gyűlik össze, ahonnan kifolyik a gyűjtőedénybe. Mivel az iszap nem ülepszik

▼M4

le, nem kell visszavezetni. Az egész elrendezés szabályozott hőmérsékletű vízfürdőben is kialakítható. A működtetés kezdeti szakaszaiban a lyukacsos edény eltömődése következtében túlfolyás fordulhat elő. Ilyenkor a lyukacsos betétet ki kell cserélni egy tisztára, amelyhez az eltömődött betét kivétele előtt egy szívócsövön keresztül át kell vezetni az iszapot az edényből egy tiszta vödörbe. Az eltömődött betét oldalaira tapadt iszapot is gondosan le kell kaparni és át kell rakni. Az eltömődött edény tisztítása során először gyenge vízsugárral lemossuk a visszamaradt iszapot, majd az edényt híg nátrium-hipoklorit oldatba és azt követően vízbe merítjük, és végül vízzel alaposan leöblítjük.

22. Az iszap levegőztető edényben történő levegőztetéséhez mindkét elrendezésben megfelelő módszert kell alkalmazni, például porlasztókövet és sűrített levegőt. Ha a levegőt tisztítani kell, akkor egy megfelelő szűrőn és levegőmosón kell átvezetni. Az aerob feltételek fenntartása és az iszappelyhek állandó szuszpenzióban tartása érdekében a vizsgálat során mindvégig elegendő mennyiségű levegőnek kell áthaladnia a rendszeren.

Szűrőkészülék vagy centrifuga

23. A minták szűrésére szolgáló, megfelelő pórusméretű (0,45 μm névleges lyukátmérőjű) membránszűrők, amelyek minimális mértékben adszorbeálják az oldható szerves vegyületeket és bocsátanak ki szerves szenet. Szerves szenet kibocsátó szűrők alkalmazása esetén a kioldódó szén eltávolítása érdekében a szűrőket meleg vízzel gondosan ki kell mosni. A másik lehetséges megoldás a 40 000 m/s^2 gyorsulás elérésére képes centrifuga alkalmazása.

Analitikai berendezések

24. A következők meghatározására alkalmas készülékek:

— DOC (oldott szerves szén) és TOC (összes szerves szén) vagy COD (kémiai oxigénigény),

— meghatározott vegyi anyag, ha szükséges,

— lebegő anyagok, pH, víz oxigénkoncentrációja,

— hőmérséklet, kémhatás,

— ammónium, nitrit és nitrát, ha a vizsgálat a nitrifikációt befolyásoló feltételek mellett kerül elvégzésre.

Víz

25. Kevesebb mint 3 mg/l DOC-koncentrációjú csapvíz. Ha a lúgosság nem ismert, meg kell határozni.

26. Kevesebb mint 2 mg/l DOC-koncentrációjú ionmentesített víz.

Szerves közeg

27. Szerves közegként mesterségesen készített szennyvíz, háztartási szennyvíz vagy ezek keverékének a használata megengedett. Kimutatták (11)(14), hogy a háztartási szennyvíz önmagában történő alkalmazása sok esetben magasabb százalékos DOC-eltávolítást eredményez, sőt olyan vegyi anyagok eltávolítását és biológiai lebontását is lehetővé teszi, amelyek az OECD által meghatározott mesterségesen készített szennyvíz alkalmazása esetén nem bonthatók le biológiailag. Ugyancsak kimutatták, hogy a háztartási szennyvíz folyamatos vagy szakaszos hozzáadása gyakran stabilizálja az eleveniszapot és a döntő fontosságú jó ülepedési képességet. Ezért háztartási szennyvíz alkalmazása ajánlott. Új tétel használata előtt mindig meg kell határozni a szerves közeg DOC vagy COD koncentrációját. A szerves közeg savasságát vagy lúgosságát ismerni kell. Ha a szerves közeg nem elég savas vagy lúgos, akkor megfelelő puffer (nátrium-hidrogén-karbonát vagy kálium-dihidrogén-foszfát) hozzáadásával lehet fenntartani a 7,5 ± 0,5 körüli pH-értéket a levegőztető edényben a vizsgálat során. Minden esetben egyedi alapon kell meghatározni, hogy mikor és mennyi puffert kell a szerves közeghez hozzáadni. Keverék folyamatosan vagy szakaszosan történő adagolása esetén gondoskodni kell arról, például vízzel való hígítás révén, hogy a keverék oldott szerves széntartalma (DOC) vagy kémiai oxigénigénye (COD) közelítőleg állandó maradjon.

▼M4

Mesterségesen készített szennyvíz

28. Csapvízben oldjunk fel literenként 160 mg peptont, 110 mg húskivonatot, 30 mg karbamidot, 28 mg dikálium-hidrogénfoszfátot (K_2HPO_4), 7 mg nátrium-kloridot (NaCl), 4 mg kalcium-klorid-dihidrátot ($CaCl_2.2H_2O$) és 2 mg magnézium-szulfát-heptahidrátot ($Mg_2SO_4.7H_20$). Ezzel az OECD által meghatározott és példaként megadott módszerrel körülbelül 100 mg/l átlagos DOC-koncentrációjú befolyó szennyvíz készíthető. Alternatívaként alkalmazható más összetétel is, amely hozzávetőleg hasonló, a valódi szennyvízéhez közelebb álló DOC-koncentrációt eredményez. Ha kisebb töménységű befolyó szennyvízre van szükség, akkor a mesterségesen készített szennyvizet hígíthatjuk csapvízzel – például 1:1 arányban, amelynek segítségével 50 mg/l körüli koncentrációt érhetünk el. Mivel a hígabb szennyvíz alkalmazása elősegíti a nitrifikáló organizmusok szaporodását, a nitrifikáló szennyvíztisztító telepek szimulációjának vizsgálata esetén ezt a módosítást el kell végezni. Desztillált vízzel kevert műszennyvíz koncentrátumot is készíthetünk, amely 1 °C hőmérsékleten egy hétig tárolható. Felhasználás előtt hígítsuk csapvízzel. (Bár ez a közeg nem teljesen megfelelő, például a nitrogén koncentrációja túl magas, míg a széntartalom viszonylag alacsony, a foszfát puffer hozzáadásán és a pepton tartalom növelésén kívül jobb javaslat eddig nem született).

Háztartási szennyvíz

29. Elsősorban háztartási szennyvizet fogadó szennyvíztisztító telepről származó, naponta frissen gyűjtött, ülepített szennyvizet használjunk. A durva részecskéktől jobbára mentes szennyvizet az elsődleges ülepítést megelőzően, az elsődleges ülepítőtartály túlfolyójából vagy az eleveniszapos üzem betáplálási pontjáról kell gyűjteni. A szennyvíz felhasználás előtt több (általában legfeljebb hét) napig tárolható 4 °C hőmérsékleten, amennyiben bizonyítható, hogy a DOC-koncentráció (vagy a COD) nem csökken jelentős mértékben (azaz legalább 20 %-kal) a tárolás során. Új tétel használata előtt mindig be kell állítani a DOC-koncentrációt (vagy a COD-t) egy megfelelő állandó értékre, például csapvíz hozzáadásával, hogy a vizsgálat során minél kisebb zavar keletkezzen.

Eleveniszap

30. Az oltóanyagként használt eleveniszapot egy elsősorban háztartási szennyvizet kezelő, megfelelően üzemeltetett szennyvíztisztító telep vagy laboratóriumi méretű eleveniszapos berendezés levegőztető tartályából gyűjtsük.

A vizsgált vegyi anyag törzsoldatai

31. A megfelelően oldható vegyi anyagok törzsoldatait ionmentesített víz vagy a mesterségesen készített szennyvíz ásványi összetevőjének felhasználásával készítjük el a megfelelő koncentrációban (például 1-5 g/l). (Az oldhatatlan és illékony vegyi anyagokra vonatkozóan lásd az 5. függeléket.) Határozzuk meg a törzsoldat DOC és összes szerves szén (TOC) tartalmát, és a későbbiekben minden új tételnél ismételjük meg a mérést. Ha a DOC és a TOC különbsége nagyobb, mint 20 %, akkor ellenőrizzük a vizsgált vegyi anyag vízoldékonyságát. A visszanyerési arány megfelelőségének ellenőrzéséhez (általában > 90 % várható) hasonlítsuk össze a DOC-tartalmat vagy a vizsgált vegyi anyag törzsoldat specifikus analízisével meghatározott koncentrációját a névleges értékkel. Különösen diszperziók esetén kell ellenőrizni, hogy a DOC használható analitikai paraméter, vagy csak a vizsgált vegyi anyagra specifikus analitikai módszert lehet alkalmazni. Diszperzió használata esetén a mintákat centrifugálni kell. Minden új tételre vonatkozóan meg kell határozni az oldott szerves széntartalmat, a kémiai oxigénigényt, illetve – specifikus analízissel – a vizsgált vegyi anyag tartalmat.

▼M4

32. Határozzuk meg a törzsoldat pH értékét. A szélsőséges értékek azt jelzik, hogy a vegyi anyag hozzáadása hatással lehet az eleveniszap pH értékére a vizsgálati elrendezésben. Ebben az esetben kis mennyiségű szervetlen sav vagy bázis segítségével semlegesíthetjük a törzsoldatot, azaz a pH értéket 7 ± 0,5-re állíthatjuk be, ügyelve arra, hogy elkerüljük a vizsgált vegyi anyag kicsapódását.

ELJÁRÁS

33. Az itt leírt eljárás eleveniszapos berendezés használata esetén alkalmazandó; „lyukacsos edény” használata esetén kis mértékben módosítani kell.

Az oltóanyag előkészítése

34. A vizsgálat kezdetén eleveniszapot vagy kisszámú mikroorganizmust használunk oltóanyagként a vizsgálati elrendezésben. Az oltóanyagot a felhasználás előtt megfelelő szellőzést biztosítva szobahőmérsékleten kell tartani, és 24 órán belül fel kell használni. Az első esetben egy főként háztartási szennyvizet fogadó, jól működő biológiai szennyvíztisztító telep vagy laboratóriumi szennyvíztisztító berendezés levegőztető tartályából eleveniszap-mintát veszünk. Nitrifikáló feltételek szimulálása esetén nitrifikáló szennyvíztisztító telepről származó mintát kell használni. Meghatározzuk a lebegőanyag koncentrációt, és szükség esetén ülepítéssel töményítjük az iszapot, hogy a lehető legkisebb mennyiséget kelljen a vizsgálati elrendezésben használni. A szárazanyag kezdeti koncentrációját 2,5 g/l-re kell beállítani.

35. A második esetben háztartási szennyvizet fogadó biológiai szennyvíztisztító telep elfolyó vizét használjuk oltóanyagként 2–10 ml/l koncentrációban, amelyhez érdemes különféle más forrásokból – például felszíni vizekből – származó oltóanyagokat hozzáadni, hogy minél több különböző baktériumfaj legyen jelen. Ebben az esetben az eleveniszap a vizsgálati elrendezésben jön létre és képződik.

A szerves közeg adagolása

36. A vizsgálat megkezdésekor és a vizsgálat alatt mindvégig gondoskodjunk arról, hogy a befolyó szennyvizet és az elfolyó vizet tartalmazó tartályok és a befolyó szennyvizet tartalmazó edényekből kivezető, illetőleg az elfolyó vizet tartalmazó edényekbe bevezető csövek mindig alaposan meg legyenek tisztítva, hogy ne alakulhassanak ki rajtuk mikrobatenyészetek. A vizsgálati elrendezést szabályozott (általában 20–25 °C) hőmérsékletű helyiségben kell felállítani, vagy vízköpenyes vizsgálati berendezéseket kell alkalmazni. Készítsünk elegendő mennyiséget a szükséges szerves közegből (27–29. bekezdés). Töltsük fel a levegőztető edényt és a szeparátort a szerves közeggel, majd adjuk hozzá az oltóanyagot (34–35. bekezdés). Indítsuk el a levegőztetést úgy, hogy az iszapot szuszpenzióban és aerob körülmények között tartsuk, majd kezdjük meg a befolyó szennyvíz adagolását, valamint a leülepedett iszap visszavezetését. A vizsgálati és a kontrollberendezésekben a szerves közeget a tárolóedényből a levegőztető edénybe kell adagolni (20–21. bekezdés), az elfolyó vizet pedig hasonló tárolóedényekben kell felfogni. A 6 órás szokásos hidraulikus tartózkodási idő eléréséhez 0,5 l/h sebességgel kell a szerves közeget pumpálni. A sebesség beállításához az adagolt szerves közeg napi mennyiségét úgy mérjük, hogy figyeljük a tárolóedényekben található mennyiség csökkenését. A vegyi anyagok szakaszos kiengedése vagy a sokkszerű terhelés hatásainak meghatározásához más adagolási módszer szükséges.

37. Ha a szerves közeget 1 napnál hosszabb ideig tartó használatra készítjük, körülbelül 4 °C hőmérsékletre kell hűteni, vagy más tartósítási módszert kell alkalmazni a mikroorganizmusok szaporodásának és a vizsgálati berendezésen kívüli biológiai lebomlás megakadályozására (29. bekezdés). Mesterségesen készített szennyvíz használata esetén tömény (példáulpéldául 10-szeres töménységű) törzsoldat készíthető (28. bekezdés), amelyet körülbelül 4 °C hőmérsékleten lehet tárolni. Ezt a törzsoldatot használat előtt megfelelő mennyiségű csapvízzel jól el kell keverni; alternatívaként közvetlenül a készülékbe adagolható, miközben a megfelelő mennyiségű csapvíz adagolása külön történik.

▼M4

A vizsgált vegyi anyag adagolása

38. A vegyi anyag törzsoldatából (31. bekezdés) töltsünk megfelelő mennyiséget a befolyó szennyvizet tartalmazó tárolóedénybe, vagy adagoljuk közvetlenül a levegőztető edénybe egy külön adagolópumpa segítségével. A vizsgálat során a befolyó szennyvíz szokásos átlagos DOC-koncentrációját 10 mg/l és 20 mg/l közötti értékre kell beállítani, a maximális koncentráció pedig nem haladhatja meg az 50 mg/l értéket. Ha a vizsgált vegyi anyag vízben rosszul oldódik, vagy toxikus hatásai lehetnek, akkor a DOC-koncentrációt 5 mg/l-re vagy annál alacsonyabb értékre csökkenthetjük, amennyiben létezik megfelelő specifikus analitikus módszer, és azt el is végeztük (a vízben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagból készített diszperzió adagolásának speciális módszereit lásd az 5. függelékben).

39. A vizsgált vegyi anyag adagolásának megkezdése előtt meg kell várni, amíg a rendszer állapota stabilizálódik, és a szerves közegből történő DOC-eltávolítás hatékonysága eléri a megfelelő szintet (kb. 80 %). A vizsgált vegyi anyag hozzáadása előtt ellenőrizni kell, hogy valamennyi berendezés egyforma hatékonysággal üzemel; ellenkező esetben a különböző iszapok összekeveredhetnek, és egyenlő mennyiség kerülhet vissza az egyes berendezésekbe. Ha (kb.) 2,5 g/l (száraz tömeg) eleveniszapot tartalmazó oltóanyagot használunk, akkor a vizsgált vegyi anyag adagolását már a vizsgálat megkezdésekor el lehet indítani, mivel a kezdettől fogva növekvő mennyiségben történő közvetlen adagolás azzal az előnnyel jár, hogy az eleveniszap jobban tud alkalmazkodni a vizsgált vegyi anyaghoz. A vizsgált vegyi anyag hozzáadásának módjától függetlenül ajánlott rendszeres időközönként ellenőrizni az áramlási sebességet és/vagy a tároló-edény(ek)ben lévő mennyiségeket.

Az eleveniszap kezelése

40. Az alkalmazott oltóanyagtól függetlenül az eleveniszap lebegőanyag-koncentrációja – a szerves közeg minőségétől és töménységétől, az üzemi feltételektől, a jelen lévő mikroorganizmusok természetétől, valamint a vizsgált vegyi anyag hatásától függően – az 1–3 g/l (száraz tömeg) tartományon belül stabilizálódik a vizsgálat során.

41. Hetente vagy gyakrabban vagy meg kell határozni a lebegőanyag-koncentrációt a levegőztető edényekben és a fölös iszap megfelelő hányadát el kell távolítani úgy, hogy a koncentráció folyamatosan 1 g/l és 3 g/l (száraz tömeg) között maradjon, vagy pedig gondoskodni kell arról, hogy az átlagos iszapkor értéke állandó – általában 6–10 nap –legyen. Így például 8 napos iszaptartózkodási idő esetén az eleveniszap 1/8-át kell minden nap eltávolítani a levegőztető edényből és megsemmisíteni. Ezt a műveletet naponta, vagy, ami előnyösebb, egy szakaszos üzemű automata szivattyú segítségével kell elvégezni. A lebegőanyag-koncentráció állandó szinten vagy egy szűk tartományon belül tartása önmagában nem biztosítja, hogy az iszaptartózkodási idő (SRT) – a vizsgált vegyi anyag elfolyó vízben mért koncentrációját meghatározó üzemi változó – értéke is állandó lesz.

42. A vizsgálat időtartama alatt naponta vagy gyakrabban el kell távolítani és újra kell szuszpendálni a levegőztető edény és a szeparátor falára tapadt iszapot. A biofilmképződés megakadályozása érdekében a csöveket és a vezetékeket rendszeresen ellenőrizni és tisztítani kell. A leülepedett iszapot lehetőleg szakaszos szivattyúzással áramoltassuk vissza a szeparátorból a levegőztető edénybe. A „lyukacsos edény” elrendezésben nem történik visszaáramoltatás, de ebben az esetben is gondoskodni kell arról, hogy a belső edényt tisztára cseréljük, mielőtt túlzottan megtelik (21. bekezdés).

43. Husmann-berendezés alkalmazása esetén előfordulhat, hogy rossz ülepedést és iszapveszteséget tapasztalunk. Ezek az alább felsorolt intézkedések legalább egyikének a vizsgálati és a kontroll berendezésnél történő egyidejű végrehajtásával orvosolhatók:

— Rendszeres időközönként – például hetente – alkalmazzunk adalékként friss eleveniszapot vagy derítőszert (például edényenként 2 ml 50 g/l $FeCl_3$) de vigyázva, hogy a vizsgált vegyi anyag ne csapódjon ki vagy lépjen reakcióba a $FeCl_3$-dal.

▼M4

— Cseréljük ki a légpumpát perisztaltikus pumpára. Ezzel lehetővé tesszük, hogy az iszap-visszaáramlás sebessége közel egyenlő legyen az alkalmazandó szennyvíz-beáramlási sebességgel, és anaerob zóna alakulhasson ki a leülepedett iszapban (a légpumpa geometriája a befolyó áramlási sebesség körülbelül 12-szeresére korlátozza az iszap-visszaáramoltatás minimális sebességét),

— Pumpáljuk szakaszosan az iszapot a szeparátorból a levegőztető edénybe (például óránként 1–1,5 l visszaáramoltatásához 2,5 óránként 5 percig).

— A habképződés miatti veszteség megelőzése érdekében használjunk nem toxikus habzásgátlót (például szilikonolaj) minimális koncentrációban.

— Rövid, lökésszerű hullámokban fúvassunk keresztül levegőt a szeparátorban lévő iszapon (például óránként 10 másodpercig).

— Adagoljuk szakaszosan a szerves közeget a levegőztető edénybe (például óránként 3–10 percig).

Mintavétel és analízis

44. Rendszeres időközönként mérni kell a levegőztető edényben lévő iszap oldott oxigén koncentrációját, hőmérsékletét és pH-értékét. Gondoskodjunk arról, hogy mindig elegendő oxigén álljon rendelkezésre (> 2 mg/l), és a hőmérséklet az előírt tartományon belül legyen (általában 20–25 °C). A 7,5 ± 0,5 pH-érték fenntartásához adagoljunk kis mennyiségű szervetlen bázist vagy savat a levegőztető edénybe vagy a befolyó szennyvízhez, illetve növeljük a szerves közeg pufferkapacitását (lásd a 27. bekezdést). Nitrifikáció esetén sav keletkezik: 1 mg N oxidációjának a terméke körülbelül 7 mg CO_3 – dal egyenértékű. A mérés gyakorisága, amely a napi és a heti mérés között mozoghat, a mérni kívánt paramétertől és a rendszer stabilitásától függ.

45. Mérni kell a kontroll és az ellenőrző berendezések befolyó szennyvízének DOC vagy COD értékét. A vizsgált vegyi anyag koncentrációját a vizsgálathoz használt befolyó szennyvízben specifikus analízissel vagy a törzsoldat koncentrációja (31. bekezdés), a felhasznált mennyiség és a vizsgálati berendezésbe adagolt szennyvíz mennyisége alapján történő becsléssel kell meghatározni. A koncentrációra vonatkozó adatok variabilitásának csökkentése érdekében a vizsgált vegyi anyag koncentrációját is ajánlott kiszámítani.

46. A gyűjtött elfolyó vízből vett megfelelő mintákat (például 24 órás összetett minták) 0,45 μm lyukátmérőjű membránszűrőn át kell szűrni vagy körülbelül 15 percig kb. 40 000 m/s^2 intenzitással centrifugálni kell. Centrifugálást akkor kell alkalmazni, ha a szűrés problémás. A DOC vagy COD meghatározását a teljes biológiai lebonthatóság méréséhez legalább egyszer meg kell ismételni, az elsődleges biológiai lebonthatóság méréséhez pedig – amennyiben ez szükséges – a vizsgált vegyi anyagra specifikus analízissel kell végezni

47. A COD alkalmazása csak akkor ajánlott, ha a vizsgálat során elég nagy koncentrációt (kb. 30 mg/l) használunk, mivel alacsony koncentrációk esetén analitikai nehézségeket okozhat. Erősen adszorbeálódó vegyi anyagok esetén ajánlott továbbá a vegyi anyagra specifikus analitikai módszert alkalmazni az adszorbeált vegyi anyag mennyiségének mérésére az iszapban.

48. A mintavétel gyakoriságát a vizsgálat várható időtartama határozza meg. Heti három mintavétel javasolt. Ha a berendezések már hatékonyan üzemelnek, akkor a vizsgált vegyi anyag bevezetését követően egytől legfeljebb hat hétig tartó időszak szükséges az alkalmazkodáshoz és az állandósult állapot eléréséhez. Lehetőség szerint 15 érvényes értéket kell gyűjteni az általában 3 hétig tartó állandósult állapot (59. bekezdés) időszaka alatt ahhoz, hogy a vizsgálat eredménye értékelhető legyen. A vizsgálatot akkor lehet befejezni, ha sikerült elérni a megfelelő lebomlási fokot (például > 90 %), és rendelkezésre áll ez a 15 érték, amely a 3 hetes időszak munkanapjaira eső analízisek eredményét képviseli. Általában törekedni kell arra, hogy a vizsgált vegyi anyag adagolásának megkezdését követően a vizsgálat legfeljebb 12 hétig tartson.

▼M4

49. Nitrifikáló iszap és a vegyi anyag nitrifikációra gyakorolt hatásai vizsgálata esetén hetente legalább egyszer kell a vizsgálati és a kontroll berendezés elfolyó vizéből vett minták ammónium és/vagy nitrit-nitrát analízisét elvégezni.

50. Minden analízist – különösen a nitrogén meghatározását – a mintavételt követő lehető legkorábbi időpontban kell elvégezni. Ha az analízist későbbre kell halasztani, akkor a mintákkal teletöltött, szorosan lezárt üvegeket körülbelül 4 °C hőmérsékleten, sötétben kell tárolni. 48 óránál hosszabb ideig történő tárolás esetén a mintákat mélyhűtéssel, sal (például literenként 10 ml 400 g/l töménységű kénsavoldat hozzáadásával) vagy megfelelő toxikus anyag (például literenként 20 ml 10 g/l töménységű higany (II)-klorid-oldat) hozzáadásával kell tartósítani. A tartósítási módszer nem befolyásolhatja az analízis eredményét.

Kapcsolt vizsgálati berendezések alkalmazása

51. Kapcsolt berendezések alkalmazása (3. függelék) esetén a vizsgálati berendezés és a hozzá tartozó kontroll berendezés levegőztető edényei között naponta cseréljünk ki azonos mennyiségű eleveniszapot (háromliteres levegőztető edény esetén 1 500 ml-ből 150 ml-t). Ha a vizsgált vegyi anyag erősen adszorbeálódik az iszapon, akkor csak a szeparátorok felülúszó folyadékát kell kicserélni. A vizsgálati eredmények kiszámításához mindkét esetben egy korrekciós tényezőt kell használni (55. bekezdés).

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVVEZETÉS

Az eredmények kezelése

52. A vizsgált vegyi anyag DOC vagy COD csökkenésének százalékos értékét a következő képlettel számítjuk ki az adott időpontokban történő értékeléshez:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

ahol:

D_t = %-os DOC vagy COD csökkenés a t időpontban

C_s = a vizsgált vegyi anyagnak tulajdonítható, lehetőleg a törzsoldat alapján becsült befolyó DOC vagy COD, (mg/l)

E = a vizsgálati berendezés elfolyó vízében mért DOC vagy COD a t időpontban (mg/l)

E_o = a kontroll berendezés elfolyó vízében mért DOC vagy COD a t időpontban (mg/l)

53. A kontroll berendezésbe adagolt szerves közeg DOC vagy COD csökkenésének foka hasznos információt nyújt az eleveniszap vizsgálat során megfigyelhető biológiai lebontó képességének az értékeléséhez. A százalékos lebomlás az alábbi képletből számítható ki:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

ahol:

D_B = a kontroll berendezésbe adagolt szerves közeg %-os DOC vagy COD csökkenése a t időpontban

C_M = a kontroll berendezésbe adagolt szerves közeg befolyó DOC vagy COD értéke (mg/l)

▼M4

Igény szerint a vizsgálati berendezésbe adagolt szerves közegnek és vizsgált vegyi anyagnak tulajdonítható százalékos DOC vagy COD csökkenés is kiszámítható a következő képletből:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

ahol:

D_T = összes %-os DOC vagy COD csökkenés a vizsgálati berendezésben

C_T = összes befolyó vagy törzsoldatokból számított DOC vagy COD a vizsgálati berendezésben

54. Amennyiben specifikus analitikai módszerrel mérjük a vizsgált vegyi anyag eltávolítását, a következő képlettel számítjuk ki a vizsgált vegyi anyag lebomlását:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

ahol:

D_{ST} = a vizsgált vegyi anyag elsődleges lebomlási %-a t időpontban

S_i = a vizsgált vegyi anyag mért vagy becsült koncentrációja a vizsgálati berendezés befolyó szennyvízében (mg/l)

S_e = a vizsgált vegyi anyag mért koncentrációja a vizsgálati berendezés elfolyó vízében a t időpontban (mg/l)

55. Kapcsolt üzemmód esetén a levegőztető edényben lévő vizsgált vegyi anyag iszapcserével történő hígításának ellensúlyozására korrekciós tényezőt kell alkalmazni (lásd 3. függelék). 6 órás átlagos hidraulikus tartózkodási idő és a levegőztető edényben lévő eleveniszap felének kicserélése esetén az alábbi képletet alkalmazva korrigálni kell a meghatározott napi lebomlási értékeket (D_t, 52. bekezdés) ahhoz, hogy a vizsgált vegyi anyag valódi lebomlását (D_{tc}) megállapíthassuk:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

A vizsgálati eredmények bemutatása

56. A D_t (vagy D_{tc}) és D_{st} százalékos lebomlást az idő függvényében ábrázoljuk (lásd 2. függelék). A vizsgált vegyi anyag vagy az oldott szerves szén bomlását mutató görbe alakjából az eltávolítási folyamatra vonatkozó következtetéseket lehet levonni.

Adszorpció

57. Ha egy vizsgált vegyi anyag esetében a vizsgálat kezdetétől fogva nagyfokú DOC-csökkenés figyelhető meg, akkor a vizsgált vegyi anyag lebomlása valószínűleg az eleveniszapban található szilárd anyagokon való adszorbeálódásának köszönhető. Ezt az adszorbeált vizsgált vegyi anyag specifikus analízissel történő meghatározásával lehet bizonyítani. Az adszorbeálható vegyi anyagok DOC-csökkenése általában nem marad mindvégig nagyfokú a vizsgálat során; a kezdetben tapasztalható nagyfokú eltávolítás rendszerint fokozatosan csökken, majd eléri az egyensúlyi értéket. Ha azonban az adszorbeálható vegyi anyag valamilyen módon a mikrobapopuláció akklimatizálódását okozza, a vizsgált vegyi anyag DOC-csökkenése a későbbiekben növekszik, majd egy magas értéken állandósul.

▼M4

Alkalmazkodási fázis

58. A statikus szűrővizsgálatokhoz hasonlóan a biológiai lebontást számos vizsgált vegyi anyag esetében egy alkalmazkodási fázis előzi meg. Az alkalmazkodási fázisban a lebontó baktériumok akklimatizálódnak vagy alkalmazkodnak, és szinte egyáltalán nem figyelhető meg a vizsgált vegyi anyag eltávolítása; ezt a baktériumok szaporodásának kezdeti időszaka követi. Miután ez a szakasz véget ért, a lebontó fázis kezdetének azt az időpontot tekintjük, amikor a vizsgált vegyi anyag kezdeti mennyiségének körülbelül 10 % százaléka kerül eltávolításra (figyelembe véve az esetleges adszorpciót). Az alkalmazkodási fázis általában rendkívül változatos és kevéssé reprodukálható.

Állandósult állapot

59. Egy folyamatos vizsgálat során a bomlási görbe állandó szakasza azt a fázist jelöli, amikor a legnagyobb fokú lebontás figyelhető meg. Az állandósult állapotnak legalább 3 hétig kell tartania, és körülbelül 15 mért értéknek kell tartoznia hozzá.

A vizsgált vegyi anyag átlagos lebomlási foka

60. Számítsuk ki a vizsgált vegyi anyag állandósult állapothoz tartozó D_t lebomlási értékeinek számtani közepét, majd kerekítsük a legközelebbi egész számra (1 %). Ez lesz a vizsgált vegyi anyag lebomlási foka. A számtani közép 95 %-os konfidencia intervallumát is ajánlott kiszámítani.

A szerves közeg lebomlása

61. A kontroll berendezésbe adagolt szerves közeg százalékos DOC vagy COD csökkenését az idő függvényében ábrázoljuk (D_B). Az átlagos lebomlási fokot ugyanúgy határozzuk meg, mint a vizsgált vegyi anyag esetében (60. bekezdés).

A biológiai lebontás jele

62. Ha a vizsgált vegyi anyag nem adszorbeálódik jelentős mértékben az eleveniszapon, és a bomlási görbe a biológiai bomlási görbére jellemző tipikus alakot mutatja (alkalmazkodási fázis, lebontó fázis, állandósult állapot) (58–59. bekezdés), a mért csökkenést biztonsággal lehet a biológiai lebontásnak tulajdonítani. Ha kezdetben nagyfokú eltávolítás figyelhető meg, a szimulációs vizsgálat nem tud különbséget tenni a biológiai és a nem biológiai bomlási folyamatok között. Ebben az esetben és minden más esetben, amikor a biológiai lebontással kapcsolatban kétségek merülnek fel (például sztrippelés esetén), analizálni kell az adszorbeált vizsgált vegyi anyagot, vagy a biológiai folyamatokra egyértelműen utaló paramétereken alapuló kiegészítő statikus biológiai lebonthatósági vizsgálatokat kell végezni. Ilyenek például az oxigénfelvételt vizsgáló módszerek (az e melléklet C.4. fejezetében szereplő D, E és F módszerek (6)), a széndioxid képződést mérő vizsgálat (az e melléklet C.4. fejezetében szereplő C módszer (6)) vagy a gőztér CO_2-tartalmának ISO szabvány szerinti vizsgálata (18), amelyhez a szimulációs vizsgálatból származó, a vizsgált vegyi anyagnak már kitett oltóanyagot használunk. Ha a DOC-eltávolítást és az adott vegyi anyag eltávolítását is mértük, az eltávolítási százalékok jelentős különbsége (az előbbi alacsonyabb, mint az utóbbi) olyan szerves köztes termékek jelenlétére utal az elfolyó vízben, amelyek nehezebben lebonthatók lehetnek, mint a kiindulási vegyi anyag.

A vizsgálati eredmények érvényessége

63. Az oltóanyag szokásos biológiai lebonthatóságára a szerves közeg kontroll berendezésben (53. bekezdés) megfigyelhető lebomlási fokából lehet következtetni. A vizsgálatot akkor tekintjük érvényesnek, ha a DOC vagy COD csökkenés foka a kontroll berendezés(ek)ben két hét elteltével meghaladja a 80 %-ot, és semmilyen szokatlan jelenséget nem figyeltünk meg.

▼M4

64. Gyorsan lebontható (referencia) vegyi anyag használata esetén a biológiai lebomlás fokának (D_t, 52. bekezdés) nagyobbnak kell lennie, mint 90 %.

65. Nitrifikáló feltételek mellett végzett vizsgálat esetén az átlagos elfolyó ammónia-N és nitrit-N koncentráció nem érheti el az 1 mg/l, illetve a 2 mg/l értéket.

66. Ha ezek a követelmények (63–65 bekezdés) nem teljesülnek, akkor a vizsgálatot más forrásból származó oltóanyaggal meg kell ismételni, el kell végezni egy referencia-vegyianyag vizsgálatát, és valamennyi kísérleti eljárást ellenőrizni kell.

Vizsgálati jegyzőkönyv

67. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— azonosító adatok,

— fizikai jelleg és adott esetben a fizikai és kémiai tulajdonságok.

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgálati elrendezés típusa, oldhatatlan és illékony vegyi anyagok vizsgálata esetén szükséges módosítások,

— a szerves közeg típusa,

— a szennyvízben található ipari szennyvizek aránya és jellege, ha ismert,

— az oltóanyag és jellege, a mintavétel helye(i), az alkalmazott koncentráció és esetleges előkezelés,

— a vizsgált vegyi anyag törzsoldata, DOC és TOC tartalom, szuszpenzió esetén az elkészítés módja, a vizsgálathoz használt koncentráció, 10-20 mg/l tartományon kívül eső DOC-koncentráció okai; a hozzáadás módszere és első időpontja, az esetleges változtatások,

— átlagos iszapkor és átlagos hidraulikus tartózkodási idő, iszapelvétel módja, iszapduzzadás, iszapveszteség stb. elkerülésének módszerei,

— alkalmazott analitikai módszerek,

— vizsgálati hőmérséklet,

— iszapduzzadás jellemzői, iszapvolumen index (SVI), eleveniszap lebegőanyag koncentrációja (MLSS),

— a szabványos eljárásoktól való bármely eltérés és az eredményeket esetlegesen befolyásoló körülmények.

Vizsgálati eredmények:

— mért adatok (DOC, COD, specifikus analízis, pH, hőmérséklet, oxigénkoncentráció, lebegőanyag koncentráció, N-vegyületek**,** ha releváns,

— D_t (vagy D_{tc}), D_B, D_{St} számított értékei táblázatos formában és a bomlási görbék,

— az alkalmazkodási fázisra és az állandósult állapotra vonatkozó információk, a vizsgálat időtartama, a vizsgált vegyi anyag lebomlási foka és a szerves közeg lebomlási foka a kontroll berendezésben, statisztikai adatokkal és a biológiai lebonthatóságra valamint a vizsgálat érvényességére vonatkozó megállapításokkal kiegészítve,

— az eredmények szöveges elemzése.

▼**M4**

SZAKIRODALOM

(1) Swisher RD (1987). „Surfactant Biodegradation”, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.

(2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.

(3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No. 70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

(4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.

(5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

(6) E melléklet C.4. fejezete: A „gyors” biológiai lebonthatóság meghatározása.

(7) E melléklet C.12. fejezete: Biológiai lebomlás – módosított SCAS-vizsgálat.

(8) E melléklet C.19. fejezete: Adszorpciós együttható (K_{OC}) becslése talajon és szennyvíziszapon nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC).

(9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3: 157-173.

(10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.

(11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; felülvizsgált szöveg 2004). Szerves vegyületek eltávolításának és biológiai lebonthatóságának meghatározása vizes közegben. Eleveniszapos szimulációs teszt.

(13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33–48.

(14) Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340–343.

(15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753–758.

(16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

(17) Her Majesty’s Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91–98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998). Vízminőség. Szerves vegyületek teljes aerob biológiai lebonthatóságának kiértékelése vizes közegben. A lezárt edényzet szervetlen széntartalmának meghatározásán alapuló módszer.

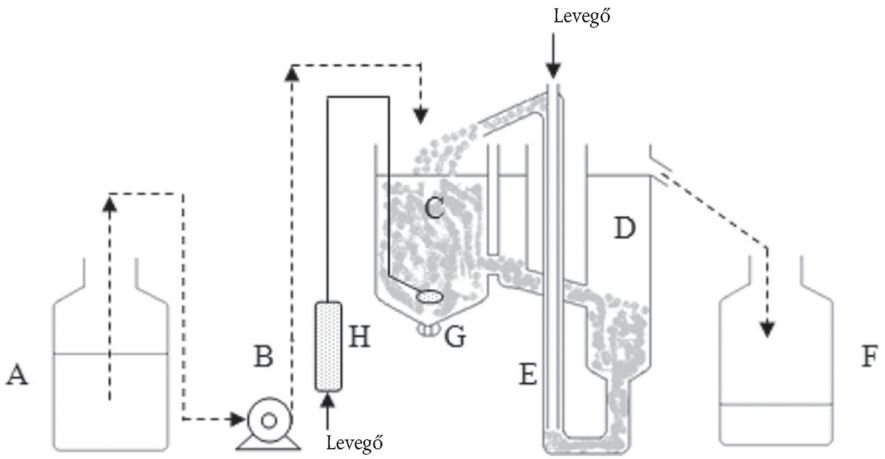
▼M4

1. függelék

1. ábra

A biológiai lebonthatóság értékelésére szolgáló készülék

Husmann-berendezés



A. Tárolóedény

B. Adagolópumpa

C. Levegőztető kamra (térfogat: 3 l)

D. Ülepítőedény

E. Légpumpa

F. Gyűjtőedény

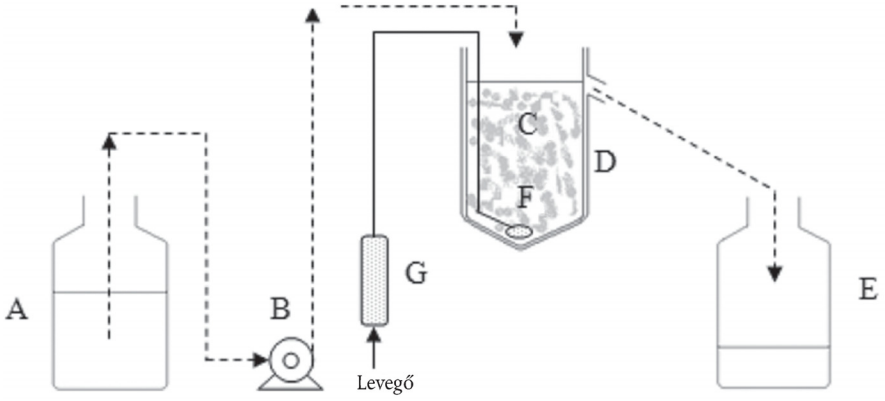
G. Levegőztető

H. Légáramlásmérő

2. ábra

A biológiai lebonthatóság értékelésére szolgáló készülék

Lyukacsos edény



A. Tárolóedény

B. Adagolópumpa

C. Lyukacsos levegőztető edény

D. Nem áteresztő anyagú külső edény

E. Gyűjtőedény

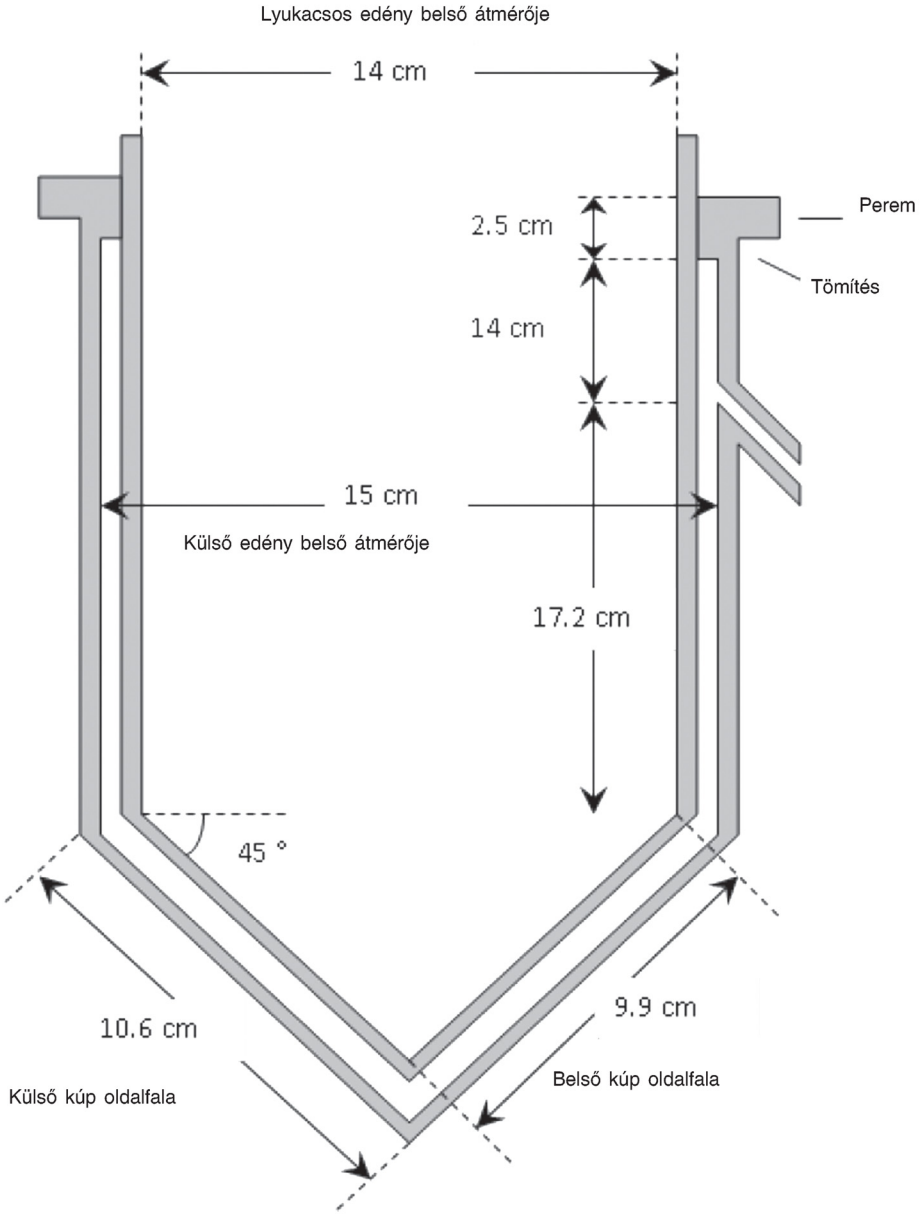
F. Porlasztókő

G. Légáramlásmérő

▼M4

3. ábra

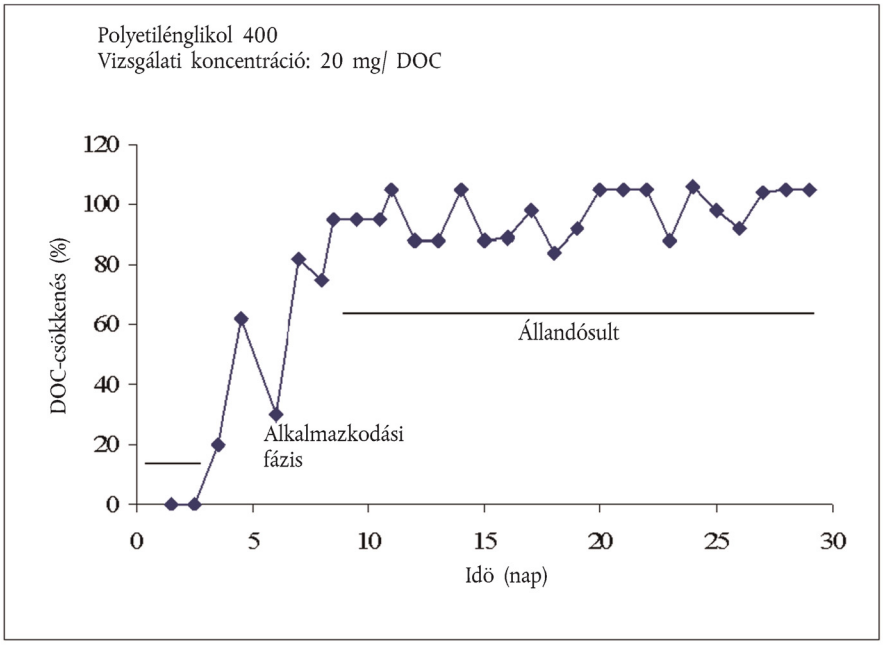
A háromliteres lyukacsos levegőztető edény részletes rajza



▼**M4**

2. függelék Á

Bomlási görbe példája



▼M4

3. függelék

[TÁJÉKOZTATÓ INFORMÁCIÓK]

KAPCSOLT BERENDEZÉSEK ALKALMAZÁSA

Az iszapcsere célja, hogy megpróbáljuk kiegyenlíteni az iszapokban kialakuló mikrobapopulációk nagyságát a vizsgálati berendezésben, amelybe a vizsgált vegyületet tartalmazó szennyvizet adagolunk, valamint a kontroll berendezésben, amelybe csak szennyvizet töltünk. (1). Az eljárás a „kapcsolt berendezések alkalmazása" nevet kapta, a módszer pedig „kapcsolt üzemmódként" ismert. Az eljárást eredetileg eleveniszapos Husmann-berendezésekkel alkalmazták, de a „lyukacsos edény" elrendezésben is sor került már a használatára (2)(3). Mivel a kapcsolt üzemmód sem a Husmann-berendezés, sem a lyukacsos edény esetén nem eredményezett jelentős eredménybeli eltérést a nem kapcsolt üzemmódhoz képest, a kapcsolt berendezések alkalmazásához szükséges idő és energia befektetése nem hoz különösebb hasznot.

Az iszapcsere következtében látszólag meglehetősen nagyarányú eltávolítás tapasztalható, mivel a vizsgált vegyi anyag egy része is áthelyezésre kerül, és ezáltal a vizsgált vegyi anyag koncentrációja közel egyenlő lesz a vizsgálati és a kontroll berendezésben. Ezért korrekciós tényezőt kell használni, amelynek értékét a kicserélt mennyiség és az átlagos hidraulikus tartózkodási idő határozza meg. A részletes számítás a szakirodalomban (1) megtalálható.

A korrigált DOC vagy COD csökkenési fok az általános képlettel számítható ki:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

ahol:

D_{tc} = korrigált %-os DOC vagy COD csökkenés

D_t = meghatározott %-os DOC vagy COD csökkenés

a = eleveniszap kicserélt hányada

r = átlagos hidraulikus tartózkodási idő (h)

Például, ha a levegőztető edény tartalmának felét cseréljük ki (a = 0,5), az átlagos hidraulikus tartózkodási idő pedig 6 óra, akkor korrigált érték kiszámításának képlete:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

SZAKIRODALOM

(1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Kémiai oxigénigény, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131–1135.

(2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Szimulációs vizsgálat. pp. 113–138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

4. függelék

ELEVENISZAP GÁTLÁS ÉRTÉKELÉSE

A vizsgált vegyi anyag hatása a folyamatra

1. Léteznek olyan vegyi anyagok (vagy szennyvizek), amelyek azon túl, hogy a szimulációs vizsgálat során nem bomlanak le, illetve távolítódnak el, gátló hatást gyakorolnak az iszapban található mikroorganizmusokra. Más vegyi anyagok alacsony koncentrációban biológiailag lebonthatók, nagyobb koncentrációban viszont gátló hatásúak (hormesis). A gátló hatást vagy egy korábbi szakaszban már észleltük, vagy a szimulációs vizsgálatban alkalmazotthoz hasonló vagy azzal azonos oltóanyaggal végzett toxicitás vizsgálattal állapítható meg (1). Ilyen módszerek az oxigénfogyasztás-gátlás mérése (e melléklet C.11. fejezete (2) és ISO 8192 (3)) vagy az iszapban található organizmusok növekedés-gátlásának értékelése (ISO 15522 (4)).

2. A szimulációs vizsgálat során a gátlás abból látható, hogy a kísérleti edény és a kontroll edény elfolyó oldott szerves szén (DOC) vagy kémiai oxigénigény (COD) értékének különbsége nagyobb, mint a vizsgált vegyi anyag formájában hozzáadott DOC. Másként kifejezve, a vizsgált vegyi anyag jelenléte következtében kisebb mértékű lesz a kezelt szerves közeg DOC (és biokémiai oxigénigény (BOD), kémiai oxigénigény (COD), és/vagy NH^{+}_{4}) értékének a százalékos csökkenése. Ennek előfordulása esetén ismételt vizsgálatot kell végrehajtani, amelynek során addig a szintig kell csökkenteni a vizsgált vegyi anyag koncentrációját, amikor a gátlás megszűnik, vagy amíg a vegyi anyag biológiai lebontása bekövetkezik. Abban az esetben azonban, ha a vizsgált vegyi anyag (vagy szennyvíz) minden vizsgált koncentrációban hátrányos hatással van a folyamatra, arra lehet következtetni, hogy a vegyi anyag biológiai úton nehezen vagy egyáltalán nem bontható. Mindazonáltal érdemes a vizsgálatot megismételni más forrásból származó eleveniszappal és/vagy fokozatosabb alkalmazkodást engedve az iszapnak.

3. Fordított esetben, ha a vizsgált vegyi anyag biológiai lebomlása az első próbálkozásra bekövetkezik a szimulációs vizsgálat során, akkor növelni kell a koncentrációt annak megállapításához, hogy az esetleges gátló hatás megállapítható legyen.

4. A gátlás mértékének meghatározására tett kísérlet során nem szabad elfelejteni, hogy az eleveniszap mikroorganizmus-populációja változhat, azaz idővel ellenállóképességet szerezhet a gátló hatású vegyi anyaggal szemben.

5. A gátlás mértékének kiszámítása:

   A teljes százalékos BOD, DOC, COD stb. csökkenés (R_o) a vizsgálati és a kontroll berendezésben a következő képlettel számítható ki:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\ \%$$

   ahol:

   I = a vizsgálati és a kontroll berendezés befolyó BOD, DOC, COD stb. értéke (mg/l)

   E = a hozzá tartozó elfolyó koncentráció (mg/l).

   Az I és E értéket korrigálni kell a vizsgálati berendezésbe adagolt vizsgált vegyi anyagnak tulajdonítható DOC-mennyiséggel, hogy a kiszámított százalékos gátlás helyes legyen.

▼**M4**

A vizsgált vegyi anyag jelenlétének tulajdonítható gátlás mértéke a következő képlettel számítható ki:

$$\% \text{ gátlás} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

ahol:

R_c = százalékos csökkenés a kontroll berendezésekben

R_t = százalékos csökkenés a vizsgálati berendezésekben

SZAKIRODALOM

(1) Reynolds L *et al*. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

(2) E melléklet C.11. fejezete: Biológiai lebomlás – eleveniszap-légzésgátlási vizsgálat.

(3) ISO 8192 (2007) Vízminőség. Az eleven iszap oxigénfogyasztás-gátlásának vizsgálata szén- és ammóniumoxidációval.

(4) ISO 15522 (1999) Vízminőség. A víz alkotóelemei által az eleven iszap mikroorganizmusaira kifejtett gátló hatás meghatározása.

▼M4

5. függelék

Vízben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok – illékony vegyi anyagok

Vízben rosszul oldódó vegyi anyagok

A vízben rosszul oldódó és oldhatatlan vegyi anyagokkal végzett, szennyvíztisztítást szimuláló vizsgálatok szakirodalma nem túl gazdag (1)(2)(3).

Nem létezik olyan módszer a vizsgált vegyi anyag eloszlatására, amely valamennyi oldhatatlan vegyi anyagra alkalmazható lenne. Az ISO 10634 szabványban (4) leírt négy fajta módszer közül kettő – az emulgálószer használata és/vagy az ultrahangos emulgálás tűnik alkalmasnak arra, hogy a szimulációs vizsgálat céljára megkíséreljünk diszperziót készíteni a vizsgált vegyi anyagból. A diszperziónak legalább 24 órán keresztül meg kell őriznie a stabilitását. A kellőképpen stabilizált diszperziót állandó keverés mellett egy tartályból (38. bekezdés) adagoljuk a levegőztető edénybe a háztartási (mesterségesen készített) szennyvíztől elkülönítve.

Ha a diszperzió stabil, meg kell vizsgálni, hogy milyen módszert alkalmazhatunk a diszpergált vizsgált vegyi anyag meghatározására az elfolyó vízben, az elfolyó víz szilárdanyag-tartalmában és az eleveniszapban. Mivel a DOC általában nem alkalmas paraméter, a vizsgált vegyi anyagra specifikus módszert kell keresni. Ezt követően meghatározzuk, hogy mi történik a vizsgált vegyi anyaggal az eleveniszapos folyamat szimulációjának folyadék és szilárd fázisaiban. A vizsgált vegyi anyag biológiai lebonthatóságát a „tömegegyensúly” alapján ítéljük meg. Ez azonban csak az elsődleges biológiai lebonthatóságot jelzi. A teljes biológiai lebonthatóság kimutatását a gyors biológiai lebonthatóság respirométeres módszer (az e melléklet C.4. fejezetében szereplő C, F vagy D módszer (5)) segítségével kísérelhetjük meg, amelyhez a szimulációs vizsgálat során a vizsgált vegyi anyag hatásának már kitett iszapot használunk oltóanyagként.

Illékony vegyi anyagok

A szennyvíztisztítás szimulációk illékony vegyi anyagok esetében történő alkalmazása egyaránt vitatott és problematikus. Vízben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagokhoz hasonlóan az illékony vegyi anyagokkal végzett szimulációs vizsgálatok szakirodalma sem túl gazdag. A tökéletes elegyítésre alkalmas hagyományos berendezésen a következő módosításokat hajtjuk végre: a levegőztető és ülepítő tartályokat légmentesen lezárjuk, a levegőáramlást áramlásmérő segítségével mérjük és szabályozzuk, az eltávozó gázt az illékony szerves anyagok elválasztására szolgáló csapdán vezetjük keresztül. Esetenként az eltávozó gázt egy vákuumpumpa segítségével Tenax és szilikagél töltetet tartalmazó tisztító csapdán vagy hűtött csapdán vezetjük keresztül gázkromatográfia céljára. A csapdázott vizsgált vegyi anyag meghatározásához analitikai módszert használunk.

A vizsgálat két részből áll. A berendezéseket először iszap nélkül üzemeltetjük, de a mesterségesen készített szennyvizet és a vizsgált vegyi anyagot a levegőztető edénybe pumpáljuk. Néhány napon keresztül elemezzük a befolyó és az elfolyó vízből, valamint az eltávozó gázból vett minták összetételét. A gyűjtött adatokból kiszámítható a vizsgált vegyi anyag sztrippeléssel történő százalékos eltávolítása (R_{vs}).

Ezt követően a sztrippelési vizsgálatnál alkalmazottal azonos feltételek mellett elvégezzük a szokásos biológiai vizsgálatot (iszappal). A berendezések hatékony működésének ellenőrzése céljából DOC vagy COD méréseket is végzünk. A vizsgálat első szakaszában alkalomszerűen meghatározzuk a vizsgált vegyi anyag jelenlétét a befolyó és az elfolyó vízben, valamint az eltávozó gázban; az alkalmazkodási fázist követően növeljük az analízisek gyakoriságát. Az állandósult állapot időszaka alatt gyűjtött adatokból kiszámítható a vizsgált vegyi anyag különféle (fizikai és biológiai) folyamatoknak tulajdonítható összes százalékos eltávolítása (R_T) a folyadékfázisban, valamint a sztrippeléssel eltávolított arány (R_V).

▼**M4**

Számítás:

a) A vizsgált vegyi anyag sztrippeléssel történő százalékos eltávolítása (R_{VP}) a nem biológiai vizsgálat során a következő képlettel számítható ki:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

ahol

R_{VP} = a vizsgált vegyi anyag illékonyságnak tulajdonítható eltávolítása (%),

S_{VP} = csapdázott vizsgált vegyi anyag, folyadékfázis koncentráció egyenértékben kifejezve (mg/l),

S_{IP} = a vizsgált vegyi anyag befolyó koncentrációja (mg/l).

b) A vizsgált vegyi anyag sztrippeléssel történő százalékos eltávolítása (R_V) a biológiai vizsgálat során a következő képlettel számítható ki:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

ahol

R_V = a vizsgált vegyi anyag illékonyságnak tulajdonítható eltávolítása (%),

S_V = a biológiai vizsgálat során csapdázott vizsgált vegyi anyag, befolyó-folyadékkoncentráció egyenértékben kifejezve (mg/l),

S_I = a vizsgált vegyi anyag befolyó koncentrációja (mg/l).

c) A vizsgált vegyi anyag különféle folyamatoknak tulajdonítható összes százalékos eltávolítása (R_T) a biológiai vizsgálat során:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

ahol

S_E = a vizsgált vegyi anyag befolyó (folyadék) koncentrációja (mg/l).

d) Következésképpen a biológia lebontással és adszorpcióval történő százalékos eltávolítás (R_{BA}) a következő képlettel számítható ki:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Az vizsgált vegyi anyag adszorbeálódásának megállapítására külön vizsgálatokat kell végezni; adszorbeálódás esetén további korrekció szükséges.

e) A biológiai kezelés vizsgált vegyi anyag légkörbe történő kibocsátására gyakorolt hatására a biológiai és a nem biológiai vizsgálat során mért, sztrippeléssel történő eltávolítási arányok (R_v és R_{vp}) összehasonlításából lehet következtetni.

Példa: Benzol

Iszaptartózkodási idő = 4 nap

Mesterségesen készített szennyvíz; tartózkodási idő = 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**

Tehát

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % and R_{BA} = 85 %.

Feltételezzük, hogy a benzol nem adszorbeálódik az iszapon.

SZAKIRODALOM

(1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939–854.

(2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

(3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Vízminőség. Útmutató a vízben rosszul oldódó szerves vegyületek előkészítésére és kezelésére azok vizes közegben való biológiai lebonthatóságának értékeléséhez.

(5) E melléklet C.4. fejezete: A „gyors” biológiai lebonthatóság meghatározása.

▼M4

6. függelék

Az iszaptartózkodási idő (SRT) hatása a vegyi anyagok kezelhetőségére

BEVEZETÉS

1. A főszövegben ismertetett módszer annak megállapítására szolgál, hogy egy vizsgált vegyi anyag (amelyről általában tudott, hogy jellegénél fogva biológiailag lebontható, de nem gyorsan lebontható) biológiailag lebontható-e a szennyvíztisztító telepek korlátai között. Az eredményt százalékos eltávolításként vagy százalékos biológiai lebonthatóságként fejezzük ki. Az eleveniszapos berendezések üzemi feltételei és a befolyó szennyvíz típusa azonban nagymértékben befolyásolják a vegyi anyag elfolyó koncentrációját. A vizsgálatok során általában csak egy névleges lebegőanyag koncentrációt vagy névleges iszaptartózkodási időt (SRT) veszünk figyelembe, holott az SRT értéke az alkalmazott iszapelvételi módszertől függően napról napra, sőt egy napon belül is nagymértékben változhat.

2. Ennél a változatnál (1)(2) jóval szűkebb határok között tartjuk az SRT értékét az egyes 24 órás időszakokon belül (ahogy a nagyméretű üzemeknél is történik), melynek eredményeként az elfolyó koncentráció állandóbb értéket mutat. Háztartási szennyvíz használata ajánlott, mivel egységesebb és magasabb eltávolítási százalékot eredményez. A különböző SRT értékek hatásai mellett részletesebb vizsgálattal a hőmérséklet bizonyos tartományon belüli változásának elfolyó koncentrációra gyakorolt hatásai is meghatározhatók.

3. Még nincs általános egyetértés arról, hogy milyen kinetikai modellel írható le a vegyi anyagok szennyvíztisztítási körülmények közötti biológiai lebomlása. Mivel a módszert csak sok tonnára rúgó mennyiségben előállított és ennek következtében a szennyvízben 1 mg/l feletti koncentrációban előforduló vegyi anyagok esetén történő alkalmazásra szánjuk, a baktérium-szaporodási sebesség szubsztrátumtól való függésének Monod-féle modelljét választottuk a gyűjtött adatok feldolgozására (1)(2). Az egyszerűsített modell és az alkalmazott feltevések érvényességének megállapítására különböző elsődleges biológiai lebonthatósági fokkal rendelkező elemekből álló alkohol-etoxilát sorozatot használtunk (2)(3).

Megjegyzés: A módszernek ez a változata sokban hasonlít a C.10. fejezet A részében leírt vizsgálati módszerhez, ezért a következőkben csak az eltéréseket ismertetjük részletesen.

A VIZSGÁLAT ELVE

4. Az iszaptartózkodási idő (SRT vagy θ_s) nagyon pontos szabályozását lehetővé tevő, (szinte) folyamatos iszapelvételt biztosító „lyukacsos edény” típusú eleveniszapos berendezéseket különböző SRT és – igény szerint – hőmérsékleti értékekkel működtetünk nem kapcsolt üzemmódban. Az iszaptartózkodási időt általában 2–10 nap, a hőmérsékletet 5–20 °C között változtatjuk. A szennyvizet (lehetőleg háztartási) és a vizsgált vegyi anyag oldatát külön adagoljuk a berendezésbe úgy, hogy a kívánt iszaptartózkodási idő (3–6 óra) és befolyó vizsgált vegyi anyag koncentráció biztosított legyen. Az összehasonlítás céljára a vizsgált vegyi anyagot nem tartalmazó kontroll berendezést működtetünk a vizsgálati berendezéssel párhuzamosan.

5. Más típusú készülék is használható, de különös gondot kell fordítani arra, hogy az SRT jól szabályozható legyen. Például, ülepítő edénnyel rendelkező berendezés használata esetén figyelembe kell venni az elfolyó lebegőanyag veszteséget. Különleges óvintézkedéseket kell tenni továbbá az ülepítő edényben lévő iszapmennyiség eltéréseiből adódó hibák elkerülése.

▼M4

6. Miután a választott üzemi feltételekkel működtetett berendezés elérte az egyensúlyi állapotot, körülbelül három héten keresztül figyeljük az állandósult állapothoz tartozó átlagos vizsgált vegyi anyag és – igény szerint – DOC-koncentrációt az elfolyó vízben. A százalékos vizsgált vegyi anyag eltávolítás és – igény szerint – DOC-csökkenés értékelése mellett grafikusan ábrázoljuk az üzemi feltételek és az elfolyó koncentráció közötti összefüggést. Ennek alapján tentatív kinetikai állandókat számíthatunk és meghatározhatjuk, hogy milyen feltételek mellett kezelhető a vizsgált vegyi anyag.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

7. A C.10. fejezet A részének 12–13. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók.

MEGFELELÉSI SZINTEK

8. A C.10. fejezet A részének 14–15. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

9. A C.10. fejezet A részének 16. bekezdésében foglaltak alkalmazandók.

A VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK MEGISMÉTELHETŐSÉGE

10. A C.10. fejezet A részének 17–18. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

11. Megfelelően módosított lyukacsos edény (6.1. függelék), amely egy 3,2 mm vastagságú és kb. 90 μm pórusátmérőjű porózus polietilénből, tompavarratos hegesztéssel készült belső edényből (vagy betétből) áll (ez a berendezés masszívabb, mint a C.10. fejezet A részének 21. bekezdésében leírt változat), amely egy áthatolhatatlan külső edényben helyezkedik el. Ez két részből áll: egy kerek alaplapból, amelybe két légvezeték és egy iszap elvezetésére szolgáló vezeték csatlakoztatására szolgáló lyukakat fúrtunk, és egy hengeres tartályból, amelyet csavarok rögzítenek az alaplaphoz, és amelynek a kimenete úgy van elhelyezve, hogy a lyukacsos edény térfogata ismert (3 l) legyen. Az egyik légvezetékhez egy porlasztókő van csatlakoztatva, a másik vége nyitott, és az edényben elhelyezett porlasztókővel derékszöget zár be. Ez a rendszer biztosítja a szükséges légáramlást ahhoz, hogy az edény tartalma tökéletesen elkeveredjen, és az oldott oxigén koncentráció értéke 2 mg/l felett legyen.

12. A megfelelő számú berendezést 5–20 °C (±1 °C) tartományon belüli szabályozott hőmérséklet mellett üzemeltetjük vízfürdőben vagy állandó hőmérsékletű helyiségben. A vizsgált vegyi anyag oldatát és az ülepített szennyvizet adagolópumpák segítségével juttatjuk a levegőztető edénybe a megfelelő adagolási sebességet (0–1,0 ml/perc, illetve 0–25 ml/perc) biztosítva, a levegőztető edényből történő iszapelvételre pedig egy harmadik szivattyút alkalmazunk. Az iszapelvételhez nagyon alacsony áramlási sebességet kell alkalmazni, amelyet a magasabb sebességre beállított szivattyú időkapcsoló segítségével történő, szakaszos működtetésével érhetünk el: például percenként 10 mp üzemidő esetén a 3 ml/percre beállított átviteli teljesítmény 0,5 ml/perc iszapelvételi sebességet biztosít.

Szűrőkészülék vagy centrifuga

13. A C.10. fejezet A részének 23. bekezdésében foglaltak alkalmazandók.

Analitikai berendezések

14. A C.10. fejezet A részének 24. bekezdésében foglaltak alkalmazandók.

Víz

▼M4

15. A C.10. fejezet A részének 25–26. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók.

Szerves közeg

16. A C.10. fejezet A részének 27. bekezdésében foglaltak alkalmazandók.

Mesterségesen készített szennyvíz

17. A C.10. fejezet A részének 28. bekezdésében foglaltak alkalmazandók.

Háztartási szennyvíz

18. A C.10. fejezet A részének 29. bekezdésében foglaltak alkalmazandók.

Eleveniszap

19. A C.10. fejezet A részének 30. bekezdésében foglaltak alkalmazandók.

A vizsgált vegyi anyag törzsoldatai

20. A C.10. fejezet A részének 31–32. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók.

ELJÁRÁS

Az oltóanyag előkészítése

21. A C.10. fejezet A részének 34. bekezdésében foglaltak alkalmazandók azzal, hogy csak eleveniszap használható (kb. 2,5 g/l).

A vizsgálati berendezések száma

22. Egy egyszerű vizsgálathoz – például a százalékos eltávolítás méréséhez – egyetlen SRT elegendő, de a kinetikai állandók számításához szükséges adatok gyűjtése már 4 vagy 5 SRT alkalmazását igényli. Általában 2–10 nap közötti értékeket kell választani. Gyakorlati szempontból kényelmes megoldás, ha egy hőmérséklet mellett párhuzamosan 4 vagy 5 különböző iszaptartózkodási idővel végezzük el a vizsgálatot; míg terjedelmesebb vizsgálatoknál ugyanazokat vagy esetleg más SRT értékeket használunk az 5–20 °C tartományon belüli más hőmérsékletekkel. Az elsődleges biológiai lebonthatóság vizsgálatához (a fő felhasználási terület) általában feltételrendszerenként egy berendezés elegendő. A teljes biológiai lebonthatóság megítéléséhez azonban minden feltételrendszerhez külön kontroll berendezés szükséges, amelybe csak szennyvizet adagolunk a vizsgált vegyi anyag nélkül. Ha feltételezhető, hogy a vizsgált vegyi anyag jelen van az alkalmazott szennyvízben, akkor az elsődleges biológiai lebonthatóság értékeléséhez is kell kontroll berendezés, a számítások során pedig el kell végezni a szükséges korrekciókat.

A szerves közeg és a vizsgált vegyi anyag adagolása

23. A C.10. fejezet A részének 36–39. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók, de a vizsgált vegyi anyag oldatát külön kell adagolni, és különböző iszapelvételi arányokat kell alkalmazni. Rendszeresen – például naponta kétszer – ellenőrizzük, hogy a befolyó, az elfolyó és az iszapelvételi sebesség a ±10 % tűréshatáron belül van, és szükség esetén állítsuk utána az áramlási sebességet. Ha háztartási szennyvizet használunk, és az analitikai módszerek alkalmazása során nehézséget tapasztalunk, akkor végezzük el a vizsgálatot mesterségen készített szennyvízzel, de gondoskodjunk arról, hogy az eltérő hordozóanyag ne eredményezzen eltérő kinetikai adatokat.

Az eleveniszapos berendezések kezelése

24. A C.10. fejezet A részének 40–43. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók, de csak az „állandó” iszap-elvétellel szabályozzuk az iszaptartózkodási időt.

Mintavétel és analízis

25. A C.10. fejezet A részének 44–50. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók azzal a kivétellel, hogy a vizsgált vegyi anyag koncentrációját kell csak meghatározni, a DOC meghatározása választható; a COD nem alkalmazandó.

▼M4

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVVEZETÉS

Az eredmények kezelése

26. A C.10. fejezet A részének 52–54. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók.

A vizsgálati eredmények bemutatása

27. A C.10. fejezet A részének 56–62. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók.

Kinetikai állandók számítása

28. A százalékos elsődleges biológiai lebonthatóságnál reálisabb képet nyújt, ha a vizsgált vegyi anyag állandósult állapothoz tartozó átlagos elfolyó koncentrációját adjuk meg, és leírjuk, hogy ez a paraméter hogyan változik az üzemi feltételek függvényében. Ehhez a 6.2. függelékben szereplő (6) egyenletet használhatjuk, amellyel meghatározható a K_S, a μ_m és a θ_{SC}, azaz a kritikus iszaptartózkodási idő.

(A másik lehetőség, hogy egy a 2. egyenlettel (6.2. függelék) megadott elméleti görbét a kapott kísérleti értékekhez illesztő egyszerű számítógépes programmal határozzuk meg a K_S és a μ_m közelítő értékeit. Bár egyetlen megoldás sem lesz egyértelmű, a K_S és μ_m elfogadható közelítését adja.)

A vizsgálati eredmények változatossága

29. Általános tapasztalat, hogy az egyes vegyi anyagok változatos kinetikai paramétereinek meghatározott értékei eltéréseket mutatnak. Vélhetőleg az iszapfejlődés körülményei és az alkalmazott vizsgálati körülmények (miként az 5. bekezdésben említett és más vizsgálatoknál) egyaránt jelentős hatást gyakorolnak a kapott értékekre. A változatosság egyik aspektusának elemzése során Grady et al (4) az „extant” és az „intrinzikus” kifejezéseket javasolta annak a két szélsőséges fiziológiai állapotnak a leírására, amelyeket egy baktériumkultúra egy kinetikai kísérlet során elérhet. Ha a vizsgálat során nem megengedett az állapotváltozás, akkor a kinetikai paraméterek értékei a mikroorganizmusok származási helyére jellemző környezeti feltételeket tükrözik; ezeket nevezzük extant, azaz „már meglévő” értékeknek. A másik szélsőség, amikor a vizsgálati körülmények a lehető leggyorsabb növekedési sebességet engedve a fehérjeszintetizáló rendszer teljes kifejlődését lehetővé teszik. Az így kapott kinetikai paraméterek intrizikusak, azaz kizárólag a szubsztrátum jellegétől és a baktériumkultúra típusától függenek. Útmutatásként elmondható, hogy ha a szubsztrátum-koncentráció kompetens mikroorganizmusokhoz viszonyított arányát (S_o/X_o) alacsonyan tartjuk (például 0,025), akkor extant értékeket kapunk, míg intrinzikus értékek akkor születnek, ha ez az arány magas (például legalább 20). Az S_o egyik esetben sem lehet kisebb, mint a K_s féltelítési állandó vonatkozó értéke.

30. A változatosság kérdésével és a biológiai lebonthatóság kinetikai vizsgálatának egyéb aspektusaival egy közelmúltban rendezett SETAC workshop is foglalkozott (5). Az ilyen és hasonló – már leírt illetve tervezett – kutatások egyre világosabb képet adnak a szennyvíztisztító telepeken végbenő folyamatok kinetikájáról, és ezáltal lehetővé teszik a jelenleg rendelkezésre álló adatok jobb értelmezését, valamint alapul szolgálnak a helytállóbb jövőbeli vizsgálati módszerek kialakításához.

SZAKIRODALOM:

(1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33–48.

(2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340–343.

(3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411–422.

▼**M4**

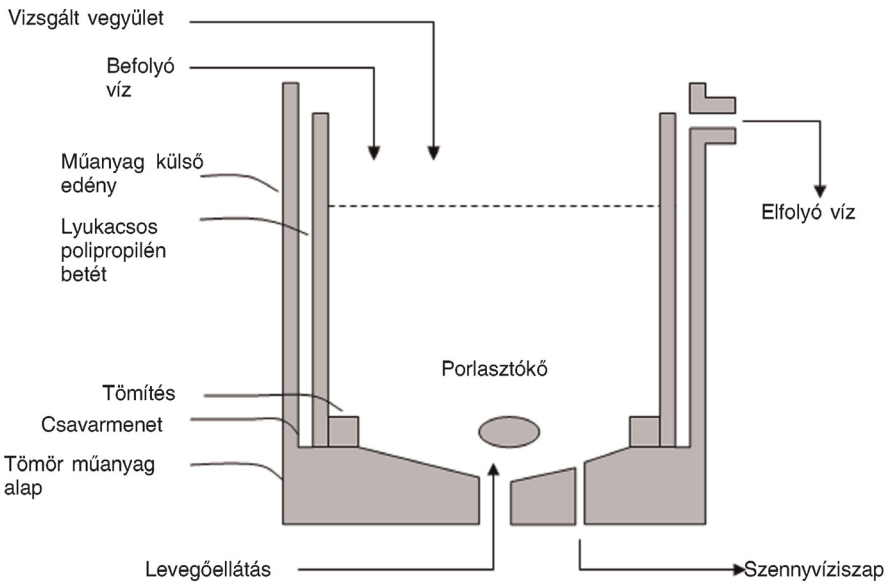
(4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742–748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4–6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼**M4**

6.1. függelék

Lyukacsos edény SRT-szabályozással



▼M4

6.2. függelék

Kinetikai állandók számítása

1. Feltételezve a Monod-féle kinetikai modell alkalmazhatóságát, valamint az aktív szilárd anyagok és a szubsztrátum tömegegyensúlyát az eleveniszapos rendszerben (1), a következő egyenlettel írható le az állandósult állapot:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

vagy

$$S_l = \frac{K_s \cdot (1 + \mathrm{K_d} \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

ahol:

S_1 = elfolyó szubsztrátum koncentráció (mg/l)

K_S = féltelítési állandó, a koncentráció amelynél $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = fajlagos növekedési sebesség (d^{-1})

μ_m = μ_m maximális értéke (d^{-1})

K_d = aktív szilárd anyagok fajlagos bomlási sebessége (d^{-1})

θ_S = átlagos iszaptartózkodási idő, SRT (d)

Az egyenlet vizsgálatából az alábbi következtetések vonhatók le:

i. Az elfolyó koncentráció független a befolyó koncentrációtól (S_0); következésképpen a százalékos biológiai lebomlás az S_0 befolyó koncentrációnak megfelelően változik.

ii. Az S_1 koncentrációt befolyásoló egyetlen üzemszabályozási paraméter az θ_S iszaptartózkodási idő.

iii. Adott S_0 befolyó koncentráció mellett a kritikus iszaptartózkodási idő:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

ahol:

θ_{SC} = kritikus iszaptartózkodási idő, amely alatt a kompetens mikroorganizmusok kimosódnak az üzemből.

iv. Mivel a (2) egyenlet többi paramétere a növekedés kinetikájával áll összefüggésben, a hőmérséklet valószínűleg befolyásolja az elfolyó szubsztrátum-szintet és a kritikus iszaptartózkodási időt, azaz a hőmérséklet csökkenésével nő az adott tisztítási fok eléréséhez szükséges iszaptartózkodási idő.

2. Feltételezve, hogy az X_2 elfolyó lebegőanyag koncentráció a levegőztető edényben mért X_1 koncentrációhoz képest alacsony, a lebegőanyagok tömegegyensúlyát alapul véve a „lyukacsos edény” rendszerben az iszaptartózkodási idő:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

és

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

ahol:

V = a levegőztető edény térfogata (l)

X_1 = lebegőanyag koncentráció a levegőztető edényben (mg/l)

X_2 = elfolyó lebegőanyag koncentráció (mg/l)

Q_0 = befolyó áramlási sebesség (l/d)

Q_1 = iszapelvétel áramlási sebessége (l/d)

Tehát a Q_1 iszapelvételi sebesség szabályozásával az iszaptartózkodási idő az előre meghatározott értéken tartható.

Következtetések:

3. A vizsgálat elsődleges célja, hogy lehetővé tegye az elfolyó koncentráció és annak alapján a vizsgált vegyi anyag fogadó vizekben mérhető előfordulási szintjének az előrejelzését.

4. Egyes esetekben az S_1 alakulását a θ_S függvényében ábrázoló görbéről azonnal leolvasható a θ_{SC} kritikus iszaptartózkodási idő (például az 1. ábrán látható 3. számú görbe). Ha ez nem lehetséges, akkor az θ_{SC}, valamint a μ_m és a K_S közelítő értékeinek a kiszámításához a $S_1 \bullet \theta_S$ függvényében ábrázoljuk az S_1 alakulását.

Az (1) egyenlet átrendezése után a következő egyenletet kapjuk:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Ha a K_d alacsony, akkor $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$, és az [5] egyenlet a következőképpen írható fel:

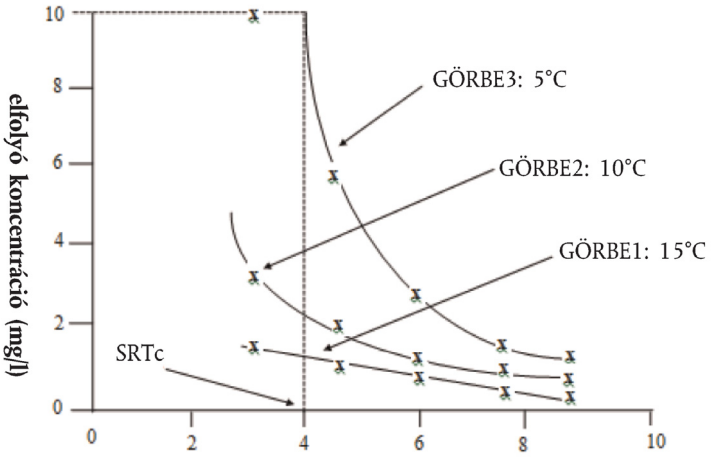
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Ez egy $1/\mu_m$ meredekségű egyenest ír le, amely áthalad a K_S/μ_m ponton; a $\theta_S \sim 1/\mu_m$ (lásd a 2. ábrát).

▼M4

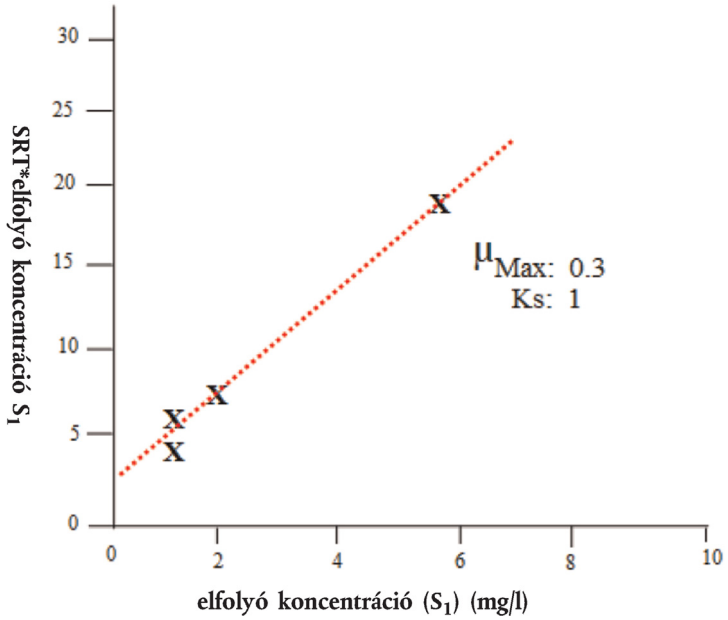
1. ábra

Az SRT alakulása három hőmérsékletérték mellett



2. ábra

Az SRT S_1 vs. S_1 regressziós egyenes T = 5 °C hőmérsékletérték mellett



Glosszárium:

elfolyó koncentráció

görbe

▼M4

7. függelék

ALACSONY (μg/l) KONCENTRÁCIÓ-TARTOMÁNYBAN VÉGZETT VIZSGÁLAT

1. Sok vegyi anyag általában rendkívül alacsony (μg/l) koncentrációban van jelen a vízi környezetben, sőt még a szennyvizekben is. Ilyen koncentrációban feltételezhetően nem szolgálnak elsődleges növekedési szubsztrátumként, hanem nagyobb a valószínűsége annak, hogy a természetesen előforduló különféle szénvegyületekhez hasonló módon, növekedést nem eredményező másodlagos szubsztrátumként kerülnek lebontásra. Következésképpen az ilyen vegyi anyagok lebomlása nem írható le a 6. függelékben bemutatott modellel. Számos alkalmazható modell létezik, és elképzelhető, hogy a szennyvíztisztító rendszerekben uralkodó körülmények között egyszerre több is működik párhuzamosan. E probléma megoldása még sok kutatást igényel.

2. A C.10. fejezet A része főszövegében ismertetett eljárás alkalmazható ugyan, de csak az elsődleges biológiai lebonthatóság értékelésére, megfelelően alacsony (< 100 μg/l) koncentrációk és validált analitikai eljárás használata mellett. A százalékos biológiai lebomlás kiszámítása (lásd a vizsgálati módszer 54. bekezdését) is lehetséges, de az abiotikus folyamatokat (adszorpció, illékonyság, stb.) is figyelembe kell venni. Példaként Nyholm és társai (1)(2) 4 órás ciklus és feltöltés-leszívás eljárás alkalmazásán alapuló kutatására lehet hivatkozni. A kutatók 5 vegyületre határoztak meg pszeudo-elsőrendű állandókat, amelyeket 5–100 μg/l koncentrációban adagoltak mesterségesen készített szennyvízhez. (A teljes biológiai lebonthatóság értékeléséhez ^{14}C-vel jelölt vizsgált vegyi anyagokat használhatunk. Ennek ismertetése meghaladja ennek a vizsgálati módszernek a kereteit, mivel elfogadott eljárások egyelőre nincsenek, bár az ISO 14592 szabvány (3) egyik javasolt módszerében útmutatást találunk a ^{14}C-vel jelölt vizsgált vegyi anyagok használatára.

SCAS vizsgálat

3. A későbbi javaslatokban egy egyszerűbb, kétlépcsős vizsgálat szerepelt (4)(5)(6), amelynek során a félfolyamatos eleveniszapos (SCAS) módszer alkalmazását követően a SCAS berendezésből gyűjtött mintákat rövid távú kinetikai vizsgálatoknak vetjük alá. A SCAS berendezést ismert iszapelvételi arányokkal (az eredeti C.12. vizsgálati módszerrel ellentétben) és az OECD iránymutatása szerinti, mesterségesen készített szennyvíz módosított változatával vagy háztartási szennyvízzel üzemeltetjük. A mesterségesen készített szennyvizet – a változó pH-érték és a rossz iszapülepedés miatt – foszfát puffer, élesztőkivonat, vas(III)-klorid és nyomelem mennyiségben sók hozzáadásával módosítjuk, COD tartalmát pedig a pepton és a húskivonat koncentrációjának növelésével mintegy 750 mg/l-re emeljük. A berendezéseket 24 órás ciklusokban működtetjük: a mesterségesen készített szennyvíz és a vizsgált vegyi anyag legfeljebb 100 μg/l (azaz a rövid távú vizsgálat során használttal hozzávetőlegesen megegyező) koncentrációban történő adagolását a 23 óráig tartó levegőztetést, az iszapelvételt, az ülepítést és a felülúszó (elfolyó) folyadék elvezetését követően kezdjük meg. A kiegyensúlyozott mikrobapopuláció fenntartása érdekében hetente egy alkalommal az összes iszap 10 %-át friss iszapra cseréljük.

4. A vizsgált vegyi anyag koncentrációját a ciklus elején és a levegőztetési periódus végén mérjük, és a vizsgálatot addig folytatjuk, amíg a vizsgált vegyi anyag eltávolítása állandó szintet ér el; ez egy héttől több hónapig tarthat.

Rövid távú vizsgálat

5. A rövid távú (például 8 órás) vizsgálat célja a vizsgált vegyi anyag különböző, ismert eredetű és múltú eleveniszapokban való lebomlása (pszeudo) elsőrendű sebességi állandójának a meghatározása. Az alkalmazkodási kísérlet (3–4. bekezdés) során a levegőztetési periódus végén, amikor a szerves szubsztrátum koncentráció alacsony, iszapmintákat veszünk a SCAS reaktorokból. Összehasonlítás céljára egy párhuzamosan üzemeltetett, a vizsgált vegyi anyagnak nem kitett SCAS berendezésből is vehetünk iszapot. Az iszap és a vizsgált vegyi anyag két vagy több eltérő, az 1–50 μg/l tartományon belüli

▼M4

koncentrációban adagolt keverékét mesterségesen készített szennyvíz vagy más szerves szubsztrátum hozzáadása nélkül levegőztetjük. Legfeljebb 24 órán keresztül rendszeres időközönként meghatározzuk az oldott vizsgált vegyi anyag maradék koncentrációját (például óránként, a vegyi anyag lebonthatóságától függően). A mintákat a megfelelő analízist megelőzően centrifugálni kell.

Számítások

6. A SCAS berendezésekből származó adatokat a vizsgált vegyi anyag százalékos eltávolításának a kiszámításához használjuk fel (54. bekezdés). Emellett a következőképpen számíthatjuk ki a (lebegőanyag koncentrációra vonatkoztatott) K_1 átlagos sebességi állandót:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln\frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

ahol:

t = levegőztetési idő (23 h)

C_e = koncentráció a levegőztetési periódus végén (μg/l)

C_i = koncentráció a levegőztetés kezdetén (μg/l)

SS = eleveniszap lebegőanyag koncentrációja (g/l)

7. A rövid távú vizsgálat során a log% maradék koncentrációt az idő függvényében ábrázoljuk. A görbe kezdeti szakaszának (10–50 % lebomlás) meredeksége a K_1 (pszeudo) elsőrendű állandónak felel meg. Az iszap lebegőanyag koncentrációjára vonatkoztatott állandó kiszámításához a meredekséget elosztjuk a lebegőanyag koncentrációval. Az eredmény bemutatásának a kiinduló vizsgált vegyi anyag és lebegőanyag koncentrációk, az iszaptartózkodási idő, az iszapterhelés és az iszap forrása, valamint a vizsgált vegyi anyagnak való kitétel előtti állapot (ha van ilyen) részletezését is tartalmaznia kell.

Az eredmények változatossága

8. A változatosság kérdésével és a biológiai lebonthatóság kinetikai vizsgálatának egyéb aspektusaival egy közelmúltban rendezett SETAC workshop is foglalkozott (7). Az ilyen és hasonló – már leírt illetve tervezett – kutatások egyre világosabb képet adnak a szennyvíztisztító telepeken végbenő folyamatok kinetikájáról, és ezáltal lehetővé teszik a jelenleg rendelkezésre álló adatok jobb értelmezését, valamint alapul szolgálnak a helytállóbb jövőbeli vizsgálati módszerek kialakításához.

SZAKIRODALOM

(1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339–353.

(2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505–1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Vízminőség. A vízben kis koncentrációban jelen lévő szerves vegyületek aerob biológiai lebonthatóságának kiértékelése.

▼**M4**

(4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and μg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851–864.

(5) Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (μg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711–735.

(6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4–6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: Biofilmek

BEVEZETÉS

1. Szimulációs vizsgálatot általában olyan vegyi anyagoknál alkalmazunk, amelyek a gyors biológiai lebonthatóság megállapítására szolgáló szűrővizsgálaton nem mentek át (az e melléklet C.4. fejezetében szereplő A–F módszerek (9)), a jellegénél fogva biológiailag lebontható anyagok azonosítására szolgáló vizsgálaton viszont átmentek. Kivételesen akkor is alkalmazható szimulációs vizsgálat, ha valamely vegyi anyagról – különösen egy sok tonnára rúgó mennyiségben előállított vegyi anyagról – több információra van szükségünk, amely esetben általában eleveniszapos vizsgálatot (C.10. fejezet A része) végzünk. Bizonyos körülmények között azonban a vegyi anyag biofilmes szennyvíztisztítási módszerekkel – nevezetesen a csepegtetőtestes, forgó biológiai kontaktoros és a fluidágyas eljárásokkal – szembeni viselkedésére vonatkozó konkrét információ szükséges. Az ilyen igények kielégítésére különféle eszközöket fejlesztettek ki.

2. Gerike *et al*. (1) nagyméretű kísérleti csepegtetőtesteket alkalmazott, amelyeket kapcsolt üzemmódban működtetett. Ezek a berendezések nagy helyet foglaltak el, és viszonylag nagy mennyiségű szennyvizet vagy mesterségesen készített szennyvizet igényeltek. Truesdale *et al*. (2) kisebb (6 ft x 6 in. átmérőjű) szűrőket írt le, amelyekbe azonban még mindig elég nagy mennyiségben kellett a felületaktív anyagoktól mentes természetes szennyvizet tölteni. Az „érett” biofilm kialakulásához hosszú, 14 hetes időszak kellett, a vizsgált felületaktív anyag adagolásának megkezdése előtti alkalmazkodáshoz pedig további 4–8 hétre volt szükség.

3. Baumann *et al.* (3) egy jóval kisebb szűrőt fejlesztett ki, amelyben egy eleveniszapban előáztatott, gyapjúszerű poliészterszalagot használtak a biofilmképződést támogató semleges közegként. Kizárólagos szénforrásként a vizsgált vegyi anyag szolgált, a biológiai lebonthatóságot pedig a befolyó és az elfolyó víz oldott szerves szén (DOC), valamint az eltávozó gáz CO_2 tartalmának mérései alapján értékelték.

4. Egy egészen más megközelítést alkalmazott a forgótárcsás reaktort feltaláló Gloyna *et al.* (4). Ebben az esetben a biofilm-képződés a vízszinteshez viszonyítva kis dőlésszögben elhelyezett forgó cső ismert területű belső felületén megy végbe a felülről befolyó szennyvíz áthaladása következtében. A reaktort felületaktív anyagok biológiai lebonthatóságának tanulmányozására (5), valamint a biofilm optimális vastagságának és a filmen való optimális áthaladásnak a vizsgálatára használták (6). A reaktort ugyanezek a szerzők továbbfejlesztették, és többek között alkalmassá tették az eltávozó gáz CO_2 tartalmának a meghatározására.

5. A forgótárcsás reaktort a Standing Committee of Analysts (UK) a vegyi anyagok biológiai lebonthatósága (7), valamint a szennyvizek kezelhetősége és toxicitása (8) értékelésének szabványos módszereként fogadta el. Az itt bemutatott módszer előnye egyszerűségében, tömörségében, reprodukálhatóságában és viszonylag korlátozott szerves közeg igényében rejlik.

A VIZSGÁLAT ELVE

6. A mesterségesen készített vagy háztartási szennyvizet és a vizsgált vegyi anyagot keverék formájában vagy külön-külön egy lassan forgó, döntött cső belsejébe vezetjük. A belső felületen a bioszűrők közegén jelen lévőhöz hasonló mikroorganizmus-réteg képződik. A reaktor működési feltételeit úgy kell megválasztani, hogy megfelelő mértékű szerves anyag lebomlást és szükség esetén ammónium oxidációt biztosítson.

▼M4

7. A csőből kifolyó vizet felfogjuk, és ülepítjük vagy szűrjük, mielőtt az oldott szerves szén (DOC) és/vagy – egy specifikus módszerrel – a vizsgált vegyi anyag mennyiségét meghatározzuk. Összehasonlítás céljából azonos feltételek mellett egyidejűleg kontroll berendezéseket működtetünk, amelyekbe nem adagolunk vizsgált vegyi anyagot. Feltételezzük, hogy a vizsgálati és a kontroll berendezések elfolyó vizében mért DOC-koncentrációk különbsége a vizsgált vegyi anyagnak és szerves metabolitjainak tulajdonítható. A vizsgált vegyi anyag lebomlásának meghatározásához ezt a különbséget összehasonlítjuk a hozzáadott vizsgált vegyi anyag (DOC) koncentrációjával.

8. A lebomlást az idő függvényében ábrázoló görbe alapos vizsgálata általában lehetővé teszi a biológiai lebontás biológiai adszorpciótól való megkülönböztetését. Megerősítése általában a gyors biológiai lebonthatóság megállapítására szolgáló (oxigénfelvétel vagy széndioxid-termelés) vizsgálat segítségével lehetséges, amelyhez abból a rektorból kell a vizsgálat végén akklimatizált oltóanyagot gyűjteni, amelybe a vizsgált vegyi anyagot adagoltuk.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

9. Az eredmények helyes értelmezéséhez ismerni kell a vizsgált vegyi anyag tisztasági, vízoldékonysági, illékonysági és adszorpciós jellemzőit.

10. Illékony és rosszul oldódó vegyi anyagok általában csak különleges óvintézkedések megtétele esetén vizsgálhatók (lásd a C.10. fejezet A részének 5. függelékét). Az elméleti értékek kiszámításához, illetve a paraméterek mért értékeinek ellenőrzéséhez (például elméleti oxigénigény (ThOD), (DOC) a kémiai szerkezet vagy legalább a tapasztalati képlet ismerete is szükséges.

11. A vizsgált vegyi anyag mikroorganizmusokra gyakorolt toxikus hatására vonatkozó információk (lásd a C.10. fejezet A részének 4. függelékét) hasznosak lehetnek a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásánál és különösen fontosak lehetnek az alacsony biológiai lebomlási értékek helyes értelmezéséhez.

MEGFELELÉSI SZINTEK

12. Az eredeti követelmények szerint egy felületaktív anyagnak legalább 80 %-os elsődleges biológiai lebonthatósági szintet kellett elérnie ahhoz, hogy forgalmazható legyen. 80 % alatti érték esetén a felületaktív anyag csak akkor forgalmazható, ha az itt bemutatott szimulációs (igazoló) vizsgálat alkalmazása során a meghatározott vegyi anyag több mint 90 %-a eltávolítható. A vegyi anyagok többségénél a megfelelési szint általában nem vet fel kérdéseket, és az eltávolítás százalékos értéke a vegyi anyagok veszélyességének értékelése során alkalmazandó várható környezeti koncentráció közelítő becsléséhez használható fel. Számos vizsgálatban a tiszta vegyületek több mint háromnegyede 90 % feletti százalékos DOC-eltávolítást mutatott, a jelentősebb fokú biológiai lebonthatóságot mutató vegyületek több mint 90 %-a pedig 80 % feletti eredményt ért el.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

13. A kísérleti eljárás helyes végrehajtásának biztosítása érdekében időnként ajánlott ismert viselkedésű vegyi anyagokat is megvizsgálni. Ezek közé tartozik például az adipinsav, a 2-fenilfenol, az 1-naftol, a difénsav, az 1-naftoesav.

A VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK MEGISMÉTELHETŐSÉGE

14. Az Egyesült Királyságban egy laboratórium megállapította, hogy a vizsgálatokon belüli relatív szórás 3,5 %, a vizsgálatok közötti 5 % volt (7).

▼M4

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

Forgótárcsás reaktorok

15. A készülék (lásd a 8. függelék 1. és 2. ábrját) fémállványra helyezett, gumikarimás tárcsákra szerelt akrilcsövekből áll, amelyek mindegyike 30,5 cm hosszú, és 5 cm belső átmérővel rendelkezik. Az egyes csöveket körülbelül 0,5 cm szélességű külső perem tartja a tárcsákon, belső felületük durva fémgyapottal van érdesítve, felső (adagoló) nyílásukon pedig egy 0,5 cm szélességű perem van kialakítva, amely megakadályozza a csövekbe kerülő folyadék kifolyását. A tiszta csőbe vezetett vizsgálati közeggel való kellő ideig tartó érintkezés eléréséhez a csöveket a vízszinteshez viszonyítva körülbelül 1 fokos dőlésszögben kell elhelyezni. A gumiabroncsos tárcsákat egy változtatható fordulatszámú motor forgatja lassú sebességgel. A csövek hőmérsékletének szabályozása végett egy állandó hőmérsékletű helyiségben állítjuk fel a készüléket.

16. Ha a forgótárcsás reaktorokat egy-egy valamivel nagyobb, fedeles csőbe helyezzük, és gondoskodunk arról, hogy a csatlakozásoknál ne szökhessenek ki gázok, akkor az eltávozó CO_2 a későbbi mérés céljából lúgos oldatban elnyelethető (6).

17. Minden egyes csőhöz egy 20 l űrtartalmú tárolóedény csatlakozik (A), amelyben 24 órára elegendő szerves közeg és – ha szükséges – hozzáadott vizsgált vegyi anyag van (lásd a 2. ábrát). Szükség esetén a vizsgált vegyi anyag oldata külön adagolható. A tárolóedény aljához közel egy kivezető nyílás van, amelyhez egy megfelelő – példáulélduál szilikongumiból készült – cső segítségével egy perisztaltikus pumpán (B) keresztül egy, a döntött cső (C) felső (adagoló) nyílásába 2–4 cm-re benyúló üveg vagy akril továbbítócső csatlakozik. Az elfolyó víz a döntött cső alsó nyílásán egy másik tárolóedénybe (D) csepeg. Az analízist megelőzően az elfolyó vizet ülepítjük vagy szűrjük.

Szűrőkészülék – centrifuga

18. A minták szűrésére olyan, megfelelő pórusméretű (0,45 μm névleges lyukátmérőjű) membránszűrőket alkalmazunk, amelyek minimális mértékben adszorbeálják a szerves vegyületeket és bocsátanak ki szerves szenet. Szerves szenet kibocsátó szűrők alkalmazása esetén a kioldódó szén eltávolítása érdekében a szűrőket meleg vízzel gondosan ki kell mosni. A másik lehetséges megoldás a 40 000 m/s^2 gyorsulás elérésére képes centrifuga alkalmazása.

19. A következők meghatározására alkalmas analitikai berendezések:

— DOC/összes szerves szén (TOC) vagy kémiai oxigénigény (COD),

— meghatározott vegyi anyag (HPLC, GC stb.), ha szükséges,

— pH, hőmérséklet, kémhatás,

— ammónium, nitrit, nitrát, ha a vizsgálatok a nitrifikációt befolyásoló feltételek mellett kerülnek elvégzésre.

Víz

20. Kevesebb, mint 3 mg/l DOC-koncentrációjú csapvíz.

21. Kevesebb, mint 2 mg/l DOC-koncentrációjú ionmentesített vagy desztillált víz.

▼M4

Szerves közeg

22. Szerves közegként mesterségesen készített szennyvíz, háztartási szennyvíz vagy ezek keveréke használható. Kimutatták, hogy a háztartási szennyvíz önmagában történő alkalmazása sok esetben magasabb százalékos DOC-eltávolítást eredményez (eleveniszapos berendezésekben), sőt olyan vegyi anyagok eltávolítását és biológiai lebontását is lehetővé teszi, amelyek az OECD által meghatározott mesterségesen készített szennyvíz alkalmazása esetén nem bonthatók le biológiailag. Ezért háztartási szennyvíz alkalmazása ajánlott. Új tétel használata előtt mindig meg kell határozni a szerves közeg DOC- vagy COD-koncentrációját. A szerves közeg savasságát vagy lúgosságát ismerni kell. Ha a szerves közeg nem elég savas vagy lúgos, akkor megfelelő puffer (nátrium-hidrogén-karbonát vagy kálium-hidrogén-foszfát) hozzáadásával lehet fenntartani a 7,5 ± 0,5 körüli pH-értéket a reaktorban a vizsgálat során. Minden esetben egyedi alapon kell meghatározni, hogy mikor és mennyi puffert kell a szerves közeghez hozzáadni.

Mesterségesen készített szennyvíz

23. Csapvízben oldjunk fel literenként 160 mg peptont, 110 mg húskivonatot, 30 mg karbamidot, 28 mg dikálium-hidrogén-foszfátot (K_2HPO_4), 7 mg nátrium-kloridot (NaCl), 4 mg kalcium-klorid-dihidrátot ($CaCl_2.2H_2O$) és 2 mg magnézium-szulfát-heptahidrátot ($Mg_2SO_4.7H_2O$). Ezzel az OECD által meghatározott és e helyütt példaként megadott módszerrel körülbelül 100 mg/l átlagos DOC-koncentrációjú befolyó szennyvíz készíthető. Alternatívaként alkalmazható más olyan összetétel is, amely hozzávetőleg hasonló ehhez, és a valódi szennyvízéhez közelebb álló DOC-koncentrációt eredményez. Desztillált vízzel kevert olyan műszennyvíz-koncentrátumot is készíthetünk, amely 1 °C hőmérsékleten egy hétig tárolható. Szükség esetén hígítsuk csapvízzel. (Bár ez a közeg nem teljesen megfelelő, például a nitrogén koncentrációja túl magas, míg a széntartalom viszonylag alacsony, a foszfátpuffer hozzáadásán és a peptontartalom növelésén kívül jobb javaslat eddig nem született.)

Háztartási szennyvíz

24. Elsősorban háztartási szennyvizet fogadó szennyvíztisztító telepről származó, naponta frissen gyűjtött, ülepített szennyvizet használjunk. A durva részecskéktől jobbára mentes szennyvizet az elsődleges ülepítőtartály túlfolyójából vagy az eleveniszapos üzem betáplálási pontjáról kell gyűjteni. A szennyvíz felhasználás előtt több (általában legfeljebb hét) napig tárolható 4 °C hőmérsékleten, amennyiben bizonyítható, hogy a DOC-koncentráció (vagy a COD) nem csökken jelentős mértékben (azaz legalább 20 %-kal) a tárolás során. Új tétel használata előtt mindig be kell állítani a DOC-koncentrációt (vagy a COD-t) egy megfelelő állandó értékre, például csapvíz hozzáadásával, hogy a vizsgálat során minél kisebb zavar keletkezzen.

Kenőanyag

25. A perisztaltikus pumpa görgőit glicerinnel vagy olívaolajjal kenjük: mindkettő alkalmas a szilikongumi csövekkel való használatra.

A vizsgált vegyi anyag törzsoldatai

26. A megfelelően oldható vegyi anyagok törzsoldatait ionmentesített víz vagy a mesterségesen készített szennyvíz ásványi összetevőjének felhasználásával készítjük el a megfelelő koncentrációban (például 1 to 5 g/l). Az oldhatatlan vegyi anyagokra vonatkozóan lásd a C.10. fejezet A részének 5. függelékét. Illékony vegyi anyagok esetén ez a módszer csak akkor alkalmazható, ha módosítjuk a forgótárcsás reaktort (16. bekezdés). Határozzuk meg a törzsoldat DOC és összes szerves szén (TOC) tartalmát, és a későbbiekben minden új tételnél ismételjük meg a mérést. Ha a DOC és a TOC különbsége nagyobb,

▼M4

mint 20 %, akkor ellenőrizzük a vizsgált vegyi anyag vízoldékonyságát. A visszanyerési arány megfelelőségének ellenőrzéséhez (általában > 90 % várható) hasonlítsuk össze a DOC-tartalmat vagy a vizsgált vegyi anyag törzsoldat specifikus analízisével meghatározott koncentrációját a névleges értékkel. Különösen diszperziók esetén kell ellenőrizni, hogy a DOC használható analitikai paraméter, vagy csak a vizsgált vegyi anyagra specifikus analitikai módszert lehet alkalmazni. Diszperzió használata esetén a mintákat centrifugálni kell. Minden új tételre vonatkozóan meg kell határozni az oldott szerves széntartalmat, a kémiai oxigénigényt, illetve – specifikus analízissel – a vizsgált vegyi anyag tartalmat.

27. Határozzuk meg a törzsoldat pH értékét. A szélsőséges értékek azt jelzik, hogy a vegyi anyag hozzáadása hatással lehet az eleveniszap pH értékére a vizsgálati elrendezésben. Ebben az esetben kis mennyiségű szervetlen sav vagy bázis segítségével semlegesíthetjük a törzsoldatot, azaz a pH értéket 7 ± 0,5-re állíthatjuk be – ügyelve arra, hogy elkerüljük a vizsgált vegyi anyag kicsapódását.

ELJÁRÁS

A szerves közeg előkészítése az adagoláshoz

28. A vizsgálat megkezdésekor és a vizsgálat alatt mindvégig gondoskodjunk arról, hogy a befolyó szennyvizet és az elfolyó vizet tartalmazó tartályok és az elvezető csövek mindig alaposan meg legyenek tisztítva, hogy ne alakulhassanak ki rajtuk mikrobatenyészetek.

29. Minden nap friss műszennyvizet (23. bekezdés) használjunk, amelyet a szilárd anyagok vagy a törzsoldat koncentrátum csapvízzel történő hígításával készítünk. Egy mérőhenger segítségével mérjük ki a szükséges mennyiséget, és töltsük egy tiszta edénybe, amelyet a befolyó szennyvíz tárolására használunk. Szükség esetén a hígítás előtt adjunk megfelelő mennyiséget a vizsgált vegyi anyag vagy a referencia-vegyianyag törzsoldatából a mesterségesen készített szennyvízhez. Egy külön tartályban is elkészíthetjük a vizsgált vegyi anyag hígított oldatát, hogy egy külön adagolópumpa segítségével adagoljuk a döntött csövekbe, amennyiben ez a megoldás kényelmesebb, vagy a vizsgált vegyi anyaggal takarékoskodni kell.

30. Alternatívaként (és lehetőség szerint) használjunk ülepített háztartási szennyvizet (24. bekezdés), amelyet lehetőleg minden nap frissen gyűjtsünk.

A forgótárcsás reaktorok működtetése

31. Egy vizsgált vegyi anyag értékeléséhez két egyforma forgótárcsás reaktor szükséges, amelyeket állandó – szokásos körülmények között 22 ± 2 °C – hőmérsékletű helyiségben kell felállítani.

32. A perisztaltikus pumpák átviteli teljesítményét úgy állítsuk be, hogy óránként 250 ± 25 ml szerves közeget továbbítsanak (a vizsgált vegyi anyag nélkül) a 18 ± 2 rpm fordulatszámmal forgó döntött csövekbe. A berendezés megfelelő működésének biztosítása és élettartamának meghosszabbítása érdekében a vizsgálat megkezdésekor és a vizsgálat időszaka alatt rendszeres időközönként kenjük a pumpacsöveket (25. bekezdés).

33. A csövek vízszinteshez viszonyított dőlésszögét úgy állítsuk be, hogy a tiszta csőbe adagolt anyag tartózkodási ideje 125 ± 12,5 mp legyen. A tartózkodási idő becsléséhez adjunk nem biológiai markert (például NaCl, semleges festékanyag) a betöltött anyaghoz: az elfolyó csúcskoncentráció eléréséhez szükséges időt tekintjük átlagos tartózkodási időnek (ha a film eléri a maximális vastagságot, a tartózkodási idő kb. 30 percre nőhet).

34. Kimutatták, hogy ezekkel az átfolyási, sebesség és idő értékekkel megfelelő mértékű (> 80 %) DOC (vagy COD) csökkenés érhető el, és nitrifikált elfolyó szennyvíz keletkezik. Elégtelen eltávolítás vagy egy adott szennyvíztisztító telep teljesítményének szimulálása esetén változtatni kell az áramlási sebességen. Az utóbbi esetben a szerves közeg adagolási sebességét úgy kell módosítani, hogy a reaktor teljesítménye megfeleljen a szennyvíztisztító teljesítményének.

▼M4

Beoltás

35. Mesterségesen készített szennyvíz használata esetén a mikroorganizmusok növekedésének beindításához elegendő a levegővel történő érintkezés, máskülönben 3 napon keresztül adjunk literenként 1 ml ülepített szennyvizet a berendezésbe adagolt folyadékhoz.

Mérések

36. Rendszeres időközönként ellenőrizzük, hogy az adagolási és a forgási sebesség az előírt határértékek között van. Mérjük továbbá az elfolyó víz pH-értékét, különösen akkor, ha nitrifikációra számítunk.

Mintavétel és analízis

37. A vizsgálat céljának megfelelő mintavételi módszert, rendszert és gyakoriságot kell választani. Használhatunk például a befolyó és az elfolyó vízből vett gyors (vagy próba) mintákat, vagy hosszabb időszakon – például 3–6 órán – keresztül gyűjtött mintákat. Az első időszakban, amikor még nem adagoljuk a vizsgált vegyi anyagot, hetente kétszer vegyünk mintát. A mintákat membránszűrő segítségével szűrjük, vagy centrifugáljuk kb. 40 000 m/s^2 intenzitással körülbelül 15 percig (18. bekezdés). A membránszűrés előtt szükség lehet a minták ülepítésére és/vagy durva szűrésére. A DOC vagy COD meghatározását legalább egyszer meg kell ismételni, és adott esetben szükség lehet a BOD, ammónium és nitrit/nitrát meghatározására.

38. Minden analízist a mintavételt és a minták előkészítését követő lehető legkorábbi időpontban kell elvégezni. Ha az analízist későbbre kell halasztani, akkor a mintákkal teletöltött, szorosan lezárt üvegeket körülbelül 4 °C hőmérsékleten, sötétben kell tárolni. 48 óránál hosszabb ideig történő tárolás esetén a mintákat mélyhűtéssel, savanyítással vagy megfelelő toxikus anyag (például literenként 20 ml 10 g/l töménységű higany (II)-klorid-oldat) hozzáadásával kell tartósítani. A tartósítási módszer nem befolyásolhatja az analízis eredményét.

Bejáratási időszak

39. Ez alatt az általában 2 hétig tartó, de 6 hétnél nem hosszabb időszak alatt éri el a felületen képződő biofilm az optimális vastagságot. A DOC (vagy COD) csökkenés (44. bekezdés) mértéke nő, majd beáll egy állandó értékre. Miután egy hasonló érték mellett mindkét berendezésnél bekövetkezett az állandósult állapot elérése, kiválasztjuk, hogy melyiket használjuk kontroll berendezésként a vizsgálat hátralevő részében, amelynek során állandó teljesítményt kell mutatnia.

A vizsgált vegyi anyag bevezetése

40. Ebben a szakaszban kezdjük adagolni a vizsgált vegyi anyagot a másik reaktorba a megfelelő – általában 10–20 mg C/l – koncentrációban.

Akklimatizációs időszak

41. Folytatjuk a heti kétszeri DOC (vagy COD) analíziseket, és ha az elsődleges biológiai lebonthatóságot kell értékelni, akkor specifikus analízis segítségével mérjük a vizsgált vegyi anyag koncentrációját. A vizsgált vegyi anyag bevezetését követően egytől hat hétig tartó – különleges körülmények között hosszabb – időszak szükséges az alkalmazkodáshoz. Miután a százalékos eltávolítás (43–45. bekezdés) elérte a maximális szintet, az állandósult állapot időszaka alatt körülbelül 3 héten keresztül 12–15 érvényes értéket kell gyűjteni az átlagos százalékos eltávolítás értékeléséhez. A vizsgálatot akkor lehet befejezettnek tekinteni, amikor kellően magas lebomlási fokot sikerült elérni. Általában törekedni kell arra, hogy a vizsgált vegyi anyag adagolásának megkezdését követően a vizsgálat legfeljebb 12 hétig tartson.

▼M4

Biofilm leválás

42. Viszonylag rendszeres időközönként nagy mennyiségű fölös biofilm válik vagy szakad le a csövek faláról. A vizsgálatok időszaka legalább két teljes növekedési és leválási ciklusra terjedjen annak érdekében, hogy az eredmények összehasonlíthatóságát ez ne befolyásolja.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVVEZETÉS

Az eredmények kezelése

43. A vizsgált vegyi anyag DOC (vagy COD) csökkenésének százalékos értékét a következő képlettel számítjuk ki az adott időpontokban történő értékeléshez:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

ahol:

D_t = százalékos DOC (vagy COD) csökkenés a t időpontban,

Cs = a vizsgált vegyi anyagnak tulajdonítható, lehetőleg a törzsoldat koncentrációja és hozzáadott mennyisége alapján becsült befolyó DOC (vagy COD) (mg/l),

E = a vizsgálati berendezés elfolyó vízében mért DOC (vagy COD) a t időpontban (mg/l),

Eo = a kontroll berendezés elfolyó vízében mért DOC (vagy COD) a t időpontban (mg/l).

A referencia-vegyianyag vizsgálata esetén a referencia-vegyianyagra vonatkozóan is végezzük el a számítást.

A kontroll reaktor teljesítménye

44. A kontroll reaktorokba adagolt szerves közeg DOC (vagy COD) csökkenésének foka hasznos információt nyújt a biofilm vizsgálat során megfigyelhető biológiai lebontó képességének az értékeléséhez. A százalékos lebomlás az alábbi képletből számítható ki:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

ahol:

Cm = a kontroll berendezésbe adagolt szerves közeg befolyó DOC vagy COD értéke (mg/l).

45. Amennyiben specifikus analitikai módszerrel mérjük a vizsgált vegyi anyag eltávolítását, a következő képlettel számítjuk ki a vizsgált vegyi anyag lebomlását:

$$DST = 100\ (1 - Se/Si)\ \%$$

ahol:

Si = a vizsgált vegyi anyag mért vagy lehetőség szerint becsült koncentrációja a vizsgálati berendezés befolyó szennyvízében (mg/l)

Se = a vizsgált vegyi anyag mért koncentrációja a vizsgálati berendezés elfolyó vízében a t időpontban (mg/l)

▼M4

Ha nem módosított szennyvíz esetén az analitikai módszer az S_c mg/l értékével egyező pozitív eredményt ad, akkor a százalékos eltávolítás (D_{SC}) kiszámítása a következő:

$$DSC = 100\ (Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\ \%$$

A vizsgálati eredmények bemutatása

46. A D_t és D_{ST} (vagy D_{SC}) százalékos lebomlást az idő függvényében ábrázoljuk (lásd a C.10. fejezet A részének 2. függelékét). A vizsgált vegyi anyag százalékos eltávolítását az állandósult állapothoz tartozó 12–15 D_T (és ha rendelkezésre áll, D_{ST}) érték (legközelebbi egész számra kerekített) számtani közepe és szórása alapján határozzuk meg. A bomlási görbe alakjából az eltávolítási folyamatokra vonatkozó következtetéseket lehet levonni.

Adszorpció

47. Ha egy vizsgált vegyi anyag esetében a vizsgálat kezdetétől fogva nagyfokú DOC-csökkenés figyelhető meg, akkor a vizsgált vegyi anyag lebomlása valószínűleg a biofilmen való adszorbeálódásának köszönhető. Ezt a biofilmről levált szilárd anyagokon adszorbeálódott vizsgált vegyi anyag meghatározásával lehet bizonyítani. Az adszorbeálható vegyi anyagok DOC-csökkenése általában nem marad mindvégig nagyfokú a vizsgálat során; a kezdetben tapasztalható nagyfokú eltávolítás rendszerint fokozatosan csökken, majd eléri az egyensúlyi értéket. Ha azonban az adszorbeálható vegyi anyag valamilyen módon a mikrobapopuláció akklimatizálódását okozza, a vizsgált vegyi anyag DOC-csökkenése a későbbiekben növekszik, majd egy magas értéken állandósul.

Alkalmazkodási fázis

48. A statikus szűrővizsgálatokhoz hasonlóan a biológiai lebontást számos vizsgált vegyi anyag esetében egy alkalmazkodási fázis előzi meg. Az alkalmazkodási fázisban a kompetens baktériumok akklimatizálódnak (vagy alkalmazkodnak), és szinte egyáltalán nem figyelhető meg a vizsgált vegyi anyag eltávolítása; ezt a baktériumok szaporodásának kezdeti időszaka követi. Miután ez a szakasz véget ért, a lebontó fázis kezdetének önkényesen azt az időpontot tekintjük, amikor a vizsgált vegyi anyag kezdeti mennyiségének körülbelül 10 % százaléka kerül eltávolításra (figyelembe véve az esetleges adszorpciót). Az alkalmazkodási fázis általában rendkívül változatos és kevéssé reprodukálható.

Állandósult állapot

49. Egy folyamatos vizsgálat során a bomlási görbe állandó szakasza azt a fázist jelöli, amikor a legnagyobb fokú lebontás figyelhető meg. Az állandósult állapotnak legalább 3 hétig kell tartania, és körülbelül 12–15 mért értéknek kell tartoznia hozzá.

A vizsgált vegyi anyag átlagos lebomlási foka

50. Számítsuk ki a vizsgált vegyi anyag állandósult állapothoz tartozó D_t (és ha rendelkezésre áll, D_{st}) lebomlási értékeinek számtani közepét, majd kerekítsük a legközelebbi egész számra (1 %). Ez lesz a vizsgált vegyi anyag lebomlási foka. A számtani közép 95 %-os konfidencia intervallumát is ajánlott kiszámítani. Hasonlóképpen számítsuk ki a kontroll berendezésbe adagolt szerves közeg átlagos lebomlási fokát (D_B).

▼M4

A biológiai lebontás jele

51. Ha a vizsgált vegyi anyag nem adszorbeálódik jelentős mértékben a biofilmen, és a bomlási görbe a biológiai bomlási görbére jellemző tipikus alakot mutatja (alkalmazkodási fázis, lebontó fázis, állandósult állapot) (48–49. bekezdés), a mért csökkenést biztonsággal lehet a biológiai lebontásnak tulajdonítani. Ha kezdetben nagyfokú eltávolítás figyelhető meg, a szimulációs vizsgálat nem tud különbséget tenni a biológiai és az abiotikus bomlási folyamatok között. Ebben az esetben és minden más esetben, amikor a biológiai lebontással kapcsolatban kétségek merülnek fel (például sztrippelés esetén), biofilm mintákon analizálni kell az adszorbeált vizsgált vegyi anyagot, vagy a biológiai folyamatokra egyértelműen utaló paramétereken alapuló kiegészítő statikus biológiai lebonthatósági (szűrő-) vizsgálatokat kell végezni. Ilyenek például az oxigénfelvételt vizsgáló módszerek (az e melléklet C.4. fejezetében szereplő D, E és F módszerek) (9) vagy a CO_2 képződést mérő vizsgálat (az e melléklet C.4. fejezetében szereplő C módszer vagy a gőztér CO_2-tartalmának vizsgálata) (10); oltóanyagként a megfelelő reaktorból származó, a vizsgált vegyi anyagnak már kitett oltóanyagot használunk.

52. Ha a DOC-eltávolítást és az adott vegyi anyag eltávolítását is mértük, az eltávolítási százalékok jelentős különbsége (az előbbi alacsonyabb, mint az utóbbi) olyan szerves köztes termékek jelenlétére utal az elfolyó vízben, amelyek nehezebben lebonthatók lehetnek; ezt vizsgálatnak kell alávetni.

Validity of test results

53. A vizsgálatot akkor tekintjük érvényesnek, ha a DOC (vagy COD) csökkenés foka (D_B) a kontroll berendezés(ek)ben 2 hetes működtetést követően meghaladja a 80 %-ot, és semmilyen szokatlan jelenséget nem figyeltünk meg.

54. Gyorsan lebontható (referencia) vegyi anyag vizsgálata esetén a biológiai lebomlás fokának nagyobbnak kell lennie, mint 90 %, és a megismételt vizsgálat során kapott érték nem mutathat 5 %-nál nagyobb eltérést. Ha ez a két feltétel nem teljesül, felül kell vizsgálni a kísérleti eljárásokat és/vagy más forrásból kell háztartási szennyvizet szerezni.

55. Hasonlóképpen, az ugyanazt a vizsgált vegyi anyagot párhuzamosan kezelő berendezésekkel kapott biológiai lebonthatósági értékek között nem lehet 5 %-nál nagyobb eltérés (amennyiben párhuzamos berendezéseket használunk). Ha ez a feltétel nem teljesül, de az eltávolítás nagyfokú, akkor az elemzést még három hétig folytatni kell. Ha az eltávolítás foka alacsony, akkor meg kell vizsgálni a vizsgált vegyi anyag gátló hatásait, amennyiben még nem ismertek, és ha kivitelezhető, akkor a vizsgált vegyi anyagot alacsonyabb koncentrációban használva meg kell ismételni a vizsgálatot.

Vizsgálati jegyzőkönyv

56. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— azonosító adatok,

— fizikai jelleg és adott esetben a fizikai és kémiai tulajdonságok.

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgálati elrendezés esetleges módosításai, különösen oldhatatlan és illékony vegyi anyagok vizsgálata esetén,

— a szerves közeg típusa,

— a szennyvízben található ipari hulladékok aránya és jellege, amennyiben vannak és ismertek,

— a beoltás módja,

▼M4

— a vizsgált vegyi anyag törzsoldata – DOC (oldott szerves szén) és TOC (összes szerves szén) tartalom, szuszpenzió esetén az elkészítés módja, a vizsgálathoz használt koncentráció(k), 10-20 mg/l tartományon kívül eső DOC-koncentráció okai; a hozzáadás módszere és első időpontja, a koncentráció esetleges változtatásai,

— átlagos hidraulikus tartózkodási idő (amikor még nincs biofilm növekedés), cső forgási sebessége, hozzávetőleges dőlésszög, ha meghatározható,

— biofilm leválás részletei, idő és intenzitás,

— vizsgálati hőmérséklet és tartomány,

— alkalmazott analitikai módszerek,

Vizsgálati eredmények:

— mért adatok: DOC, COD, specifikus analízis, pH, hőmérséklet, N-vegyületek**,** ha releváns,

— a számított D_t (vagy D_{tc}), D_B, D_S adatok táblázatos formában és a bomlási görbék,

— az alkalmazkodási fázisra és az állandósult állapotra vonatkozó információk, a vizsgálat időtartama, a vizsgált vegyi anyag, a referencia-vegyianyag (ha vizsgált) és a szerves közeg (kontroll berendezésben) lebomlási foka, statisztikai adatokkal és a biológiai lebonthatóságra valamint a vizsgálat érvényességére vonatkozó megállapításokkal kiegészítve,

— az eredmények szöveges elemzése.

SZAKIRODALOM

(1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753-758.

(2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441–444.

(3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

(4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355–1357.

(5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92–94.

(6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865–881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

(9) E melléklet C.4. fejezete: A „gyors" biológiai lebonthatóság meghatározása, A–F részek.

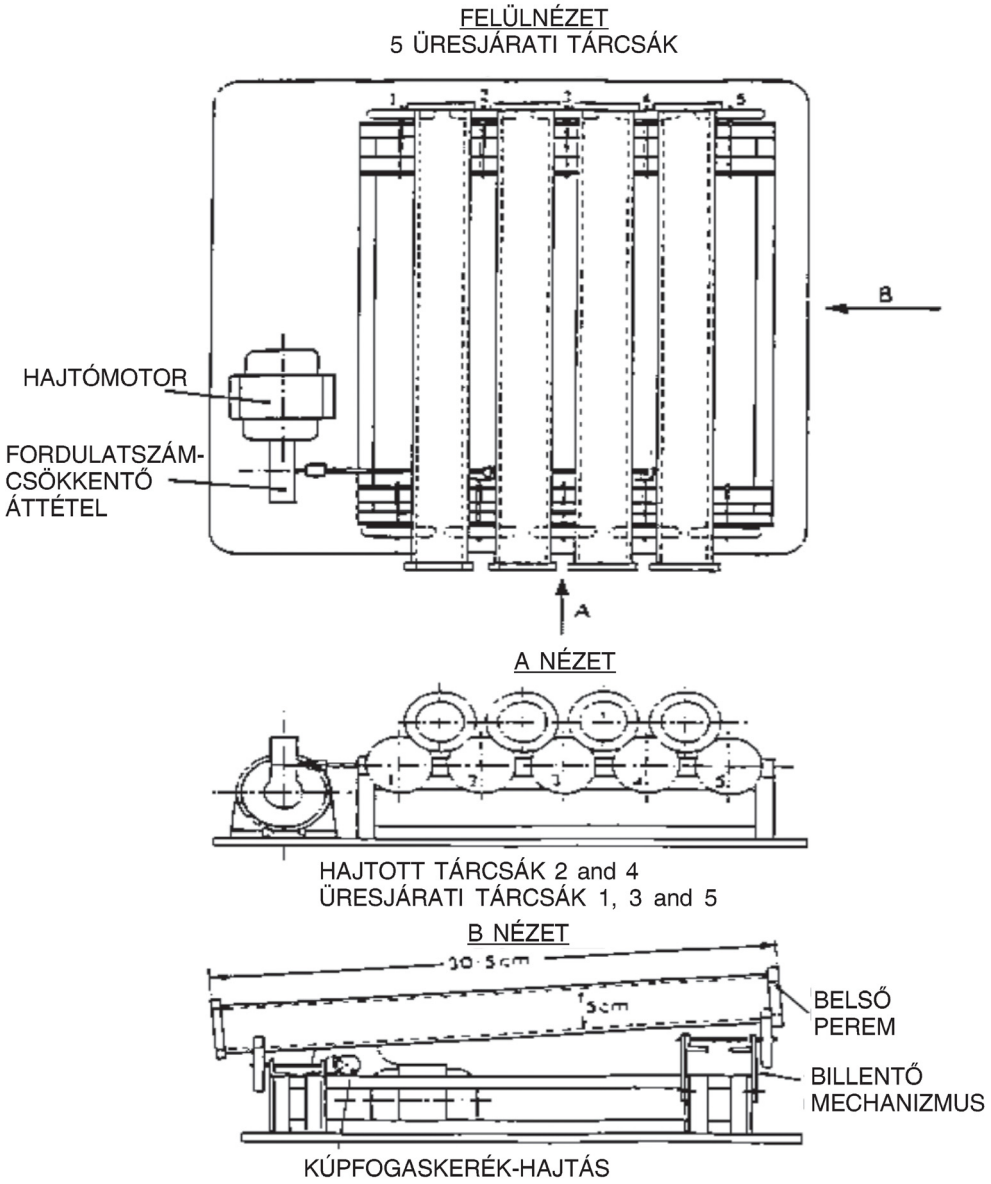
(10) ISO 14593 (1998). Vízminőség. Szerves vegyületek teljes aerob biológiai lebonthatóságának kiértékelése vizes közegben. A lezárt edényzet szervetlen széntartalmának meghatározásán alapuló módszer.

▼M4

8. függelék

1. ábra

Forgótárcsás reaktor



Glosszárium:

felülnézet

A/B nézet

hajtott tárcsák

üresjárati tárcsák

hajtómotor

fordulatszám-csökkentő áttétel

belső perem

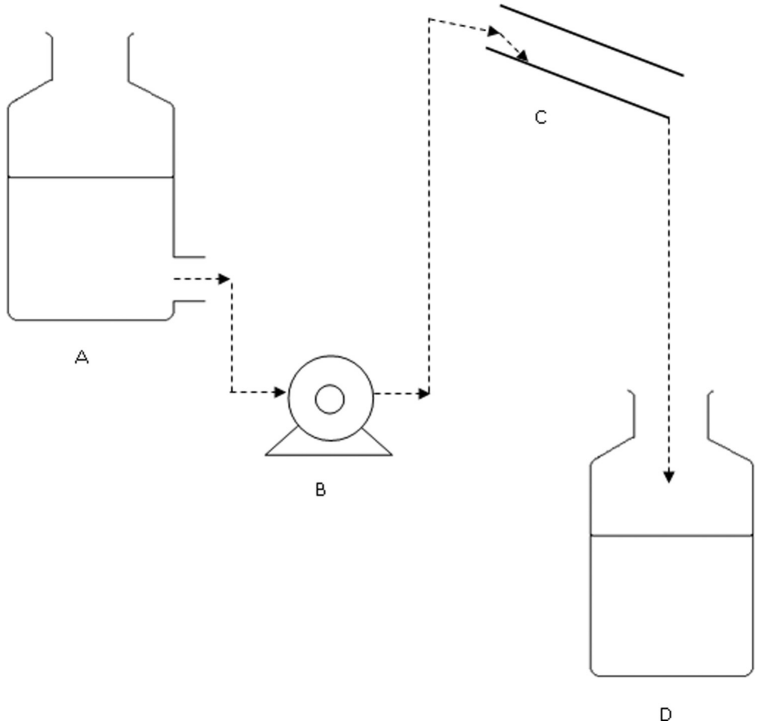
billentő mechanizmus

kúpfogaskerék-hajtás

▼**M4**

2. ábra

Áramlási diagram



A: Adagolótartány

B: Perisztaltikus pumpa

C: Forgó cső

D: Elfolyó víz gyűjtőtartálya

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK:

Vizsgált vegyi anyag: Bármely, ennek a vizsgálati módszernek az alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Vegyi anyagok: „Meg kell jegyezni, hogy a ’vegyi anyag’ kifejezést tág értelemben használják az UNCED-szerződésekben és a későbbi dokumentumokban, hogy a termékeket, keverékeket, készítményeket vagy a létező rendszerekben a hatály megjelölésére használt egyéb kifejezéseket magában foglalja”.

▼M6

C.11. ELEVENISZAP LÉGZÉSGÁTLÓ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA (SZÉN ÉS AMMÓNIUM OXIDÁCIÓJA)

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 209. vizsgálati iránymutatásában (2010) leírt módszerrel. Ez a vizsgálati módszer egy olyan módszert ír le, amellyel úgy mutatható ki valamely vegyi anyag hatása az eleveniszapból származó mikroorganizmusok (főként baktériumok) működésére, hogy meghatározott körülmények között a vizsgált vegyi anyag különböző koncentrációinak jelenlétében mérik a légzés sebességét (szén és ammónium oxidációja). A vizsgálati módszer az ETAD (a festékanyag gyártóipar ökológiai és toxikológiai egyesülete) vizsgálatán (1) (2), az OECD korábbi 209. vizsgálati iránymutatásán (3) és a módosított ISO 8192 szabványon (4) alapul. A vizsgálat célja, hogy gyors szűrést tegyen lehetővé a vegyi anyagok azon hatásának értékelésére, amelyet a szennyvízkezelő telepek eleveniszapos biológiai (aerob) szakaszában közreműködő mikroorganizmusokra gyakorolnak. A vizsgálati eredmények a vizsgált vegyi anyagok biológiai lebonthatósági vizsgálatok során használandó megfelelő, nem gátló koncentrációinak indikátoraként is szolgálhatnak (például e melléklet C.4. A–F, C.9., C.10., C12. és C29. fejezetei, az OECD 302C. vizsgálati iránymutatása). Ebben az esetben a vizsgálatot – a koncentrációtartomány-meghatározási vagy határérték-vizsgálathoz hasonlóan (lásd a 39. pontot) – szűrővizsgálatként is lehet végezni, kizárólag a teljes légzést figyelembe véve. Ezt az információt azonban óvatosan kell kezelni a gyors biológiai lebonthatósági tesztek esetében (e melléklet C.4. A–F és C.29. fejezetei), amelyeknél az oltóanyag koncentrációja lényegesen alacsonyabb, mint az e vizsgálati módszerben használt koncentráció. Sőt, a gátlásnak az ebben a légzési vizsgálatban megfigyelt hiánya nem jelent automatikusan nem gátló feltételeket az e melléklet C.4. A–F és C.29. fejezetében tárgyalt gyors biológiai lebonthatósági vizsgálatban.

2. Összességében úgy tűnik, hogy a légzésgátlási vizsgálatot első megjelenése óta sikerrel alkalmazzák, de néhány alkalommal hamis eredményeket jelentettek, pl. (2) (4) (5). A koncentrációval összefüggő légzési görbék néha kétfázisúak, a dózis-válasz görbék eltorzultak és az EC_{50}-értékek váratlanul alacsonyak voltak (5). A vizsgálatok azt mutatták, hogy ilyen eredmények akkor adódnak, ha a vizsgálatban használt eleveniszap jelentős mértékben nitrifikál, és a vizsgált vegyi anyag nagyobb hatást gyakorol az ammónium oxidációjára, mint az általános heterotróf oxidációra. Ezért ezeket a hamis eredményeket úgy lehet leküzdeni, ha a nitrifikáció egy specifikus inhibitora segítségével további vizsgálatokat végeznek. Ha az oxigénfelvételi arányokat egy ilyen inhibitor, pl. N-allil-tiokarbamid (ATU) jelenlétében és anélkül mérik, külön kiszámítható a teljes, a heterotróf és a nitrifikációs oxigénfelvételi arány (4) (7) (8). Így meg lehet határozni a vizsgált vegyi anyagnak a két folyamatra gyakorolt gátló hatásait, és a szerves szén oxidáció (heterotróf) és az ammónium-oxidáció (nitrifikáció) EC_{50}-értéke a szokásos módon számítható. Meg kell jegyezni, hogy bizonyos ritka esetekben az N-allil-tiokarbamid gátló hatása részlegesen vagy teljesen semlegesítődhet a vizsgált vegyi anyagokkal vagy a tápoldat-kiegészítőkkel, pl. Cu^{++}-ionokkal történő komplexképződés eredményeként (6). A Cu^{++}-ionok elengedhetetlenek a *Nitrosomonas* baktériumok esetében, de nagyobb koncentrációban toxikusak.

3. A szennyvíz aerob kezelése során történő nitrifikáció, amely a nitrogénvegyületek szennyvizekből – a gáz halmazállapotú termékek denitrifikációja által – történő eltávolításának egy szükséges lépése, egyre sürgetőbbé vált, különösen az európai országokban; az EU most alacsonyabb határértéket határozott meg a befogadó vizekbe kibocsátott kezelt szennyvizek nitrogénkoncentrációja tekintetében ([1]).

([1]) A Tanács 1991. május 21-i 91/271/EGK irányelve a települési szennyvíz kezeléséről. HL L 135., 1991.5.30., 40–52. o.

▼M6

4. A legtöbb esetben a szerves szén oxidációs folyamataira gyakorolt hatás értékelésére szolgáló módszer önmagában elegendő. Ugyanakkor bizonyos esetekben kizárólag a nitrifikációra gyakorolt hatás vizsgálatára, vagy különkülön a nitrifikációra és a szerves szén oxidációjára gyakorolt hatás vizsgálatára van szükség az eredmények értelmezése és a hatások megértése érdekében.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

5. Szintetikus szennyvízzel táplált eleveniszap-minták légzési sebességét mérik egy oxigén-elektródot tartalmazó zárt cellában, háromórás érintkezési időt követően. A reális expozíciós forgatókönyv mérlegelése alapján hosszabb érintkezési időre lehet szükség. Ha a vizsgált vegyi anyag gyorsan lebomlik, pl. abiotikusan hidrolízis útján, vagy illékony, és a koncentrációját nem lehet megfelelően fenntartani, rövidebb expozíciós időt (pl. 30 perc) lehet használni. Az egyes eleveniszap-sorozatok érzékenységét az expozíció napján megfelelő referencia-vegyianyaggal ellenőrizni kell. A vizsgálatot általában a vizsgált vegyi anyag EC_x-értékének (pl. EC_{50}) és/vagy az észlelhető hatást még nem okozó koncentrációnak (NOEC) a meghatározásához használják.

6. Az oxigénfelvétel mértékének N-allil-tiokarbamid – az ammónium első szintű nitrifikáló baktériumok által nitritté történő oxidációjának specifikus inhibitora – távollétében és jelenlétében történő mérésével a szerves szenet oxidáló mikroorganizmusok oxigénfelvételének gátlását az ammóniumot oxidáló mikroorganizmusok oxigénfelvételének gátlásától elkülönítve is ki lehet fejezni. Ebben az esetben az oxigénfelvétel sebességének százalékos gátlását úgy számítják ki, hogy az oxigénfelvételnek a vizsgált vegyi anyag jelenlétében mutatott sebességét a specifikus inhibitor, az N-allil-tiokarbamid jelenlétében és távollétében egyaránt összehasonlítják a vizsgált vegyi anyagot nem tartalmazó megfelelő kontrollok átlagos oxigénfelvételi sebességével.

7. Az abiotikus folyamatokból származó oxigénfelvételt úgy lehet kimutatni, hogy a vizsgált vegyi anyagból, szintetikus szennyvíz tápoldatból és vízből álló, eleveniszapot nem tartalmazó keverékben meghatározzák az oxigénfelvételi sebességet.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

8. A vizsgált vegyi anyag azonosítóját (lehetőleg CAS-számát), nevét (IUPAC), tisztaságát, vízben való oldhatóságát, gőznyomását, illékonyságát és adszorpciós jellemzőit ismerni kell ahhoz, hogy az eredményeket megfelelően értelmezni lehessen. Normális esetben az illékony vegyi anyagokat nem lehet megfelelően vizsgálni, kivéve, ha külön óvintézkedések tesznek (lásd a 21. pontot).

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ALKALMAZHATÓSÁGA

9. A vizsgálati módszer vízben oldható, gyengén oldható és illékony vegyi anyagok esetében alkalmazható. Korlátozott oldhatóságú vegyi anyagok esetében azonban előfordulhat, hogy nem mindig lehet megkapni az EC_{50}-értéket, illékony vegyi anyagok esetében pedig érvényes eredményeket csak akkor lehet kapni, ha a vizsgált vegyi anyag nagyobbik része (mondjuk > 80 %) a reakcióelegyben marad az expozíciós periódus(ok) végén. További alátámasztó analitikai adatokat kell benyújtani az EC_x koncentráció pontosítása céljából, ha a vizsgált anyag stabilitását vagy volatilitását bizonytalanság övezi.

▼M6

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

10. A referencia-vegyianyagokat rendszeres időközönként meg kell vizsgálni a vizsgálati módszer és vizsgálati feltételek megbízhatóságának ellenőrzése érdekében, illetve az expozíció napján ellenőrizni kell a mikrobiális oltóanyagként használt eleveniszap egyes tételeinek érzékenységét. A 3,5-diklórfenol (3,5-DCP) ajánlott referencia gátló vegyi anyagként, mivel a légzés ismert inhibitora és számos gátlási/toxicitási vizsgálatban használják (4). A réz(II)-szulfát-pentahidrát szintén használható a teljes légzés referencia gátló vegyi anyagaként (9). Az N-metil-anilin a nitrifikáció specifikus referencia-inhibitoraként használható (4).

ÉRVÉNYESSÉGI KRITÉRIUMOK ÉS REPRODUKÁLHATÓSÁG

11. A vak (vizsgált vegyi anyag vagy referencia-vegyianyag nélküli) kontrollok oxigénfelvételének sebessége nem lehet kevesebb, mint 20 mg oxigén per egy gramm eleveniszap (lebegő szilárd anyagok száraz tömege) óránként. Amennyiben a sebesség alacsonyabb, a vizsgálatot mosott eleveniszappal vagy más forrásból származó iszappal meg kell ismételni. A kontroll ismétlések oxigénfelvételi sebességének variációs együtthatója nem haladhatja meg a 30 %-ot a meghatározó vizsgálat végén.

12. Az ISO által 2004-ben szervezett és háztartási szennyvízből származó eleveniszap felhasználásával végzett nemzetközi körvizsgálatban (4) a 3,5-DCP EC_{50}-értékét a 2–25 mg/l közötti tartományban találták a teljes légzés szempontjából, az 5–40 mg/l tartományban a heterotróf légzés szempontjából, és a 0,1–10 mg/l tartományban a nitrifikációs légzés szempontjából. Ha a 3,5-DCP EC_{50}-értéke nem a várt tartományban helyezkedik el, a vizsgálatot más forrásból származó eleveniszappal meg kell ismételni. A réz(II)-szulfát-pentahidrát EC_{50}-értékének az 53–155 mg/l tartományban kell elhelyezkednie a teljes légzés szempontjából (9).

A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Vizsgálati edények és készülékek

13. A szokásos laboratóriumi berendezéseket, illetve a következő eszközöket kell használni:

a) Vizsgálati edények – például 1 000 ml-es főzőpoharak az 500 ml reakcióelegy részére (lásd az 5. eszközt az 1. ábrán);

b) Az oldott oxigén koncentrációjának mérésére szolgáló cella és mellékletei; egy megfelelő oxigén-elektród; egy zárt cella, amely felső üres tér nélkül tartalmazza a mintát, illetve egy érzékelő (pl. a 7., 8. és 9. eszköz a 2. függelék 1. ábráján); alternatív megoldásként egy BOD-palack is használható, amely esetében az oxigén-elektródot egy alkalmas hüvely adapter rögzíti a palack nyakában (lásd a 3. függelék 2. ábráját). Az oxigén-elektród beillesztésekor bekövetkező folyadékvesztés elkerülése érdekében célszerű először egy tölcsért vagy üvegcsövet behelyezni a hüvelybe, vagy kifelé hajló peremű edényt használni. Mindkét esetben mágneses keverőt vagy alternatív keverési módszert, pl. önkeverő szondát kell használni;

c) Semleges anyaggal bevont mágneses keverők és követők, amelyek a mérőkamrában és/vagy a vizsgálati edényekben használhatók;

d) Levegőztető berendezés: ha szükséges, sűrített levegőt kell megfelelő szűrőn a por és az olaj eltávolítása, illetve vizet tartalmazó mosó palackokon a levegő nedvesítése érdekében keresztülvezetni. Az edények tartalmát Pasteur-pipettával vagy más, vegyi anyagokat nem adszorbeáló

▼M6

levegőztető eszközzel levegőztetni kell. 150–250 rpm sebességgel üzemeltetett körpályás rázógépet lehet használni például 2 000 ml kapacitású lombikokkal, hogy kielégítsék az iszap oxigénigényét és leküzdjék az olyan vegyi anyagokkal kapcsolatos nehézségeket, amelyek túlzott mennyiségű habot termelnek, illékonyak és ezért elvesznek, vagy nehezen diszpergálhatók, ha levegőöblítéssel levegőztetik őket. A vizsgálati rendszer jellemzően több folyamatosan levegőztetett és egymást követően (pl. kb. 10–15 perces időközönként) létrehozott, majd szekvenciális módon analizált főzőpohárból áll. A levegőztetést és a keverékek oxigénfogyasztási sebességének mérését egtyidejűleg lehetővé tevő validált műszerek is használhatók;

e) pH-mérő;

f) Centrifuga, általános asztali centrifuga iszap részére, amely 10 000 m/s^2 centrifugális gyorsulásra képes.

Reagensek

14. Az egész eljárás során analitikai tisztaságú reagenseket kell használni.

Víz

15. Kevesebb, mint 1 mg/l DOC-t tartalmazó desztillált vagy ionmentesített vizet kell használni, kivéve, ha klórmentes csapvíz van megadva.

Mesterséges szennyvíz tápszer

16. A közeget úgy kell elkészíteni, hogy az alábbi összetevőket tartalmazza a megadott mennyiségben:

— pepton	16 g
— húskivonat (vagy hasonló növényi kivonat)	11 g
— karbamid	3 g
— nátrium-klorid (NaCl)	0,7 g
— kalcium-klorid-dihidrát ($CaC1_2$, $2H_2O$)	0,4 g
— magnézium-szulfát-heptahidrát ($MgSO_4$, $7H_2O$)	0,2 g
— vízmentes kálium-monohidrogén-foszfát (K_2HPO_4)	2,8 g
— desztillált vagy ionmentesített vízzel 1 literre feltöltve	

17. 7,5 (± 0,5) pH-jú oldatot kell kapnunk. Ha az elkészített közeget nem használjuk fel azonnal, sötét helyen 0–4 °C közötti hőmérsékleten legfeljebb egy hétig, vagy olyan körülmények között lehet tárolni, amelyek nem okoznak változást a közeg összetételében. Meg kell jegyezni, hogy ez a szintetikus szennyvíz „A szintetikus detergensekben használt felületaktív anyagok biológiai lebonthatóságának meghatározásához javasolt módszer” című OECD technikai jelentésben (1976. június 11.) megadott recept százszoros koncentrátuma, dikálium-hidrogén-foszfáttal kiegészítve.

▼M6

18. Alternatív megoldásként a közeg komponenseit a tárolás előtt egyedileg is sterilizálni lehet, vagy a peptont és a húskivonatot röviddel a vizsgálat elvégzése előtt is hozzá lehet adni. Használat előtt a közeget alaposan meg kell keverni, és ha szükséges, a pH-t 7,5 ± 0,5 értékre kell beállítani.

Vizsgált vegyi anyag

19. A vízben könnyen oldódó vizsgált anyagok esetében törzsoldatot kell készíteni, de csak a maximális vízoldhatóság mértékéig (csapadék nem fogadható el). A vízben rosszul oldódó anyagokat, a különböző vízoldhatóságú összetevőkből álló keverékeket és az adszorbens anyagokat közvetlenül a vizsgálati edényekbe kell mérni. Ezekben az esetekben törzsoldatok használata is alternatíva lehet, ha a vizsgált vegyi anyagok oldott koncentrációit analitikailag meghatározzák a vizsgálati edényekben (az eleveniszap hozzáadása előtt). Ha vízben oldódó frakciókat (WAF) készítenek, a vizsgált vegyi anyagok oldott koncentrációinak a vizsgálati edényekben történő analitikai meghatározása is elengedhetetlen. A szerves oldószerek vagy diszpergálószerek/emulgeálószerek oldhatóság javítása céljából történő használata kerülendő. A törzsoldatok ultrahangos keverése és a szuszpenziók előkeverése – pl. az éjszaka folyamán – akkor lehetséges, ha elegendő információ áll rendelkezésre a vizsgált vegyi anyag ilyen körülmények között mutatott stabilitása vonatkozásában.

20. A vizsgált vegyi anyag káros hatással lehet a vizsgálati rendszer pH-jára. A vizsgált vegyi anyaggal kezelt keverékek pH-ját a vizsgálat felállítása előtt – egy előzetes vizsgálat keretében – meg kell határozni annak megállapítása céljából, hogy a fő vizsgálat előtt szükség lesz-e a pH kiigazítására, illetve ismét meg kell határozni a fő vizsgálat napján. A vizsgált vegyi anyag vizes oldatait/szuszpenzióit az oltóanyag hozzáadása előtt semlegesíteni kell, ha szükséges. Mivel azonban a semlegesítés megváltoztathatja a vegyi anyag kémiai tulajdonságait, a vizsgálat céljaitól függően további vizsgálatokat is lehet végezni annak értékelése érdekben, hogy a vizsgált vegyi anyag milyen hatást gyakorol az iszapra a pH beállítása nélkül.

21. Az illékony vegyi anyagok toxikus hatásai – különösen az olyan vizsgálatokban, amelyben a levegőt buborékoltatnak át a rendszeren – változó hatásszinteket eredményezhetnek az expozíciós idő alatt bekövetkező anyagveszteség miatt. Az ilyen anyagokkal óvatosan kell eljárni, és el kell végezni az anyagot tartalmazó kontrollkeverékek anyagspecifikus elemzését, módosítva a levegőztetést.

Referencia-vegyianyag

22. Ha 3,5-diklór-fenolt használnak referencia-vegyianyagként, akkor 1,00 g 3,5-diklór-fenolt 1 000 ml vízben feloldva törzsoldatot kell készíteni (15). Meleg vizet és/vagy ultrahangos keverést kell használni az oldódás gyorsítása érdekében, és az oldatot akkor kell feltölteni a megfelelő térfogatra, ha szobahőmérsékletre hűlt. Ugyanakkor azonban biztosítani kell, hogy a referencia-vegyianyag szerkezetileg ne módosuljon. Az oldat pH-ját ellenőrizni kell és szükség esetén NaOH-dal vagy H_2SO_4-val pH 7-8 értékre ki kell igazítani.

23. Ha réz(II)-szulfát-pentahidrátot használnak referencia-vegyianyagként, akkor 58 mg/l, 100 mg/l és 180 mg/l (1,8-szeres) koncentrációt használnak. Az anyagot közvetlenül a vizsgálati edényekbe mérlegelik (29–50–90 mg 500 ml teljes térfogathoz). Ezt azután 234 ml autoklávozott csapvízzel feloldják. A réz(II)-szulfát-pentahidrát könnyen oldódik. A vizsgálat kezdetekor 16 ml szintetikus szennyvizet és 250 ml eleveniszapot adnak hozzá.

▼M6

A nitrifikáció specifikus inhibitora

24. 2,32 g/l koncentrációjú N-allil-tiokarbamid (ATU) törzsoldatot kell készíteni. Ebből a törzsoldatból 2,5 ml hozzáadása az 500 ml végső térfogatú inkubációs elegyhez 11,6 mg ATU/l (10^{-4}mol/l) végső koncentrációt eredményez, amely köztudottan elegendő ahhoz (4), hogy 100 %-ban gátolja a nitrifikációt az 1,5 g/l lebegő szilárd anyagot tartalmazó nitrifikáló eleveniszapban.

Abiotikus kontroll

25. Bizonyos ritkán előforduló helyzetekben egy erős redukáló tulajdonságú vizsgált vegyi anyag mérhető abiotikus oxigénfogyasztást okozhat. Ilyen esetekben abiotikus kontrollokra van szükség, hogy meg lehessen különböztetni a vizsgált vegyi anyag abiotikus oxigénfelvételét és a mikrobiális légzést. Abiotikus kontrollokat az oltóanyag vizsgálati keverékekből való kihagyásával lehet előállítani. Oltóanyag nélküli abiotikus kontrollokat lehet akkor is bevonni, ha alátámasztó analitikai méréseket végeznek a vizsgálat expozíciós szakaszában elért koncentráció meghatározására, pl. amikor vízben rosszul oldódó vegyi anyagok törzsoldatait különböző vízoldhatóságú összetevőkkel használják. Meghatározott esetekben sterilizált oltóanyagmal készített abiotikus kontrollra lehet szükség (pl. autoklávban vagy sterilizáló toxikus anyagok hozzáadásával). Néhány vegyi anyag csak akkor termel vagy fogyaszt oxigént, ha a felület elég nagy a reakcióhoz, akkor is, ha általában sokkal magasabb hőmérsékletre vagy nyomásra van szükség ehhez. E tekintetben különös figyelmet kell fordítani a peroxi-vegyületekre. A sterilizált oltóanyag nagy felületet biztosít.

Oltóanyag

26. Általános használatra az eleveniszapot a levegőztető medence kilépési pontján kell gyűjteni, vagy a kifolyó közelében a tartályból, egy túlnyomórészt háztartási szennyvizet fogadó jól működő szennyvíztisztító telepről. A vizsgálat céljától függően egyéb megfelelő típusú vagy forrásból származó eleveniszap is használható (pl. a laboratóriumban termesztett iszap), ha a szuszpendált szilárd anyag koncentrációja 2–4 g/l. A különböző szennyvízkezelő telepekről származó iszapok azonban más jellegzetességeket és érzékenységet mutathatnak.

27. Az iszapot begyűjtött állapotában is lehet használni, de a durva részecskéket el kell távolítani, vagy rövid (pl. 5–15 perces) ülepítéssel és a finomabb szilárd anyagokat tartalmazó felső réteg dekantálásával vagy szitálással (pl. 1 mm^2 lyukmérettel). Alternatív megoldásként az iszapot turmixgépben kb. 15 másodpercig vagy hosszabb ideig homogenizálni lehet, de óvatosságra van szükség az nyírási erők és a hőmérsékletváltozás miatt, amelyek a hosszú ideig tartó keverés során előfordulhatnak.

28. Az iszap mosására gyakran szükség van, például ha az endogén légzés alacsony. Az iszapot először egy ideig centrifugálni kell, pl. 10 percen át kb. 10 000 m/s^2 centrifugális gyorsuláson, hogy tiszta felülúszót és a szennyvíz szilárd anyagaiból álló üledéket kapjunk. A felülúszó folyadékot el kell távolítani és az iszapot rázatás közben újra kell szuszpendálni klórmentes csapvízben, majd a mosóvizet újbóli centrifugálás és leöntés útján el kell távolítani. A mosási és centrifugálási folyamatot szükség esetén meg kell ismételni. Az ismert térfogatú újraszuszpendált iszap száraz tömegét meg kell határozni, és az iszapot a folyadék eltávolításával be kell töményíteni vagy további kell hígítani klórmentes csapvízzel az iszap kívánt szilárdanyag-koncentrációjának (3 g/l) eléréséig. Az eleveniszapot folyamatosan

▼M6

levegőztetni kell (pl. 2 l/perc) a vizsgálati hőmérsékleten, és lehetőség szerint a gyűjtés napján fel kell használni. Ha ez nem lehetséges, az iszapot naponta táplálni kell szintetikus szennyvíz tápszerrel (50 ml szintetikus szennyvíz tápszer/l eleveniszap) további két napig. Az iszapot ezután fel kell használni a vizsgálathoz és az eredményeket érvényesnek kell tekinteni, feltéve, hogy nem történt jelentős változás az aktivitásában, amelyet az endogén heterotróf és nitrifikációs légzési sebesség alapján kell értékelni.

29. Nehézségek merülhetnek fel, ha olyan mértékű habképződés lép fel az inkubáció alatt, amelynek következtében a hab és a rajta található szilárd iszaprészecskék eltávoznak a levegőztető edényekből. Esetenként a habzás egyszerűen a szintetikus szennyvíz jelenlétéből ered, de a habzással számolni kell, ha a vizsgált vegyi anyag felületaktív vagy felületaktív anyagot tartalmaz. Az iszap szilárd anyagainak a vizsgálati keverékből való elvesztése mesterségesen lecsökkentett légzési sebességet eredményez, amely tévesen gátlás eredményeként is értelmezhető. Ezen túlmenően, egy felületaktív anyag oldatának levegőztetése a felületaktív anyagot a habrétegben koncentrálja; a hab elvesztése a vizsgálati rendszerből csökkenti az expozíciós koncentrációkat. A habzás egyszerű mechanikai módszerekkel is kontrollálható (pl. alkalmi manuális keverés egy üvegbot segítségével), vagy úgy, hogy felületaktív anyagtól mentes szilikonemulzió habzásgátló szert adnak hozzá és/vagy alkalmazzák a lombikrázásos levegőztető módszert. Ha a probléma a szintetikus szennyvíz jelenlétéhez társul, módosítani kell a szennyvíz összetételét egy habzásgátló reagens pl. 50 µl/l. mennyiségben történő hozzáadásával. Ha a habzást a vizsgált vegyi anyag okozza, a csökkentéséhez szükséges mennyiséget a maximális vizsgált koncentráción kell meghatározni, majd minden egyes levegőztető edényt azonos módon kell kezelni (beleértve például a vak kontrollokat és a referencia edényeket is, ahol nincs hab). Ha habzásgátló anyagokat használnak, az nem léphet kölcsönhatásba az oltóanyagmal és/vagy a vizsgált vegyi anyaggal.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

30. Három különböző oxigénfelvétel gátlását lehet meghatározni: teljes, csak heterotróf és nitrifikáció okozta oxigénfelvétel. Normális esetben elegendő a teljes oxigénfelvétel gátlásának mérése. A szerves szén oxidációjából eredő heterotróf oxigénfelvételre, illetve az ammónium oxidációjából eredő oxigénfelvételre gyakorolt hatások bemutatására akkor van szükség, ha egy adott vegyi anyaggal kapcsolatban specifikus igény merül fel két ilyen különböző végpont iránt vagy (adott esetben) a teljes oxigénfelvétel gátlásáról készült atípusos dózis-válasz görbéket kell megmagyarázni.

Vizsgálati körülmények

31. A vizsgálatot a 20 ± 2 °C hőmérsékleti tartományban kell elvégezni.

Vizsgálati keverékek

32. Vizsgálati keverékeket (F_T az 1. táblázat szerint) kell készíteni vízből, szintetikus szennyvíz tápszerből és a vizsgált vegyi anyagból úgy, hogy azok a vizsgált vegyi anyag különböző névleges koncentrációit tartalmazzák (térfogatokat és összetevőket tartalmazó példáért lásd az 1. táblázatot). A pH-t 7,5 ± 0,5 értékre kell beállítani, ha szükséges; a keverékeket vízzel fel kell hígítani és az oltóanyagot hozzá kell adni úgy, hogy az edényekben azonos végső térfogatok legyenek és meg lehessen kezdeni a levegőztetést.

Referencia keverékek

33. A vizsgált vegyi anyag helyett referencia vegyi anyagot, például 3,5-diklórfenolt tartalmazó keverékeket (F_R) kell készíteni a vizsgálati keverékekkel megegyező módon.

▼M6

Blank („vak”) kontrollok

34. Vak kontrollokat (FB) kell készíteni az expozíciós idő elején és végén azokban a vizsgálatokban, amelyekben a vizsgálati főzőpoharak egymás után időközönként vannak beállítva. Az olyan berendezések használatával végzett vizsgálatokban, amelyek lehetővé teszik az oxigénfogyasztás egyidejű mérését, legalább két vak kontrollt kell minden egyidejű vizsgálatra kerülő tételbe bevonni. A vak kontrollok megegyező térfogatú eleveniszapot és szintetikus közeget tartalmaznak, de nem tartalmazzák a vizsgált vegyi anyagot vagy a referencia-vegyianyagot. Ezeket a vizsgált és referencia keverékekkel megegyező térfogatra kell hígítani vízzel.

Abiotikus kontroll

35. Szükség esetén, például ha a vizsgált vegyi anyagról ismert vagy feltételezik, hogy erős redukáló tulajdonsággal rendelkezik, egy F_A keveréket kell készíteni az abiotikus oxigénfogyasztás mérése céljából. A keveréknek a vizsgált keverékekkel megegyező mennyiségű vizsgált vegyi anyagot és szintetikus szennyvíz tápszert kell tartalmaznia és azzal megegyező térfogatúnak kell lennie, de eleveniszapot nem tartalmazhat.

Általános eljárás és mérések

36. A vizsgálati keverékeket, a referencia keverékeket, valamint a vak és abiotikus kontrollokat a vizsgálati hőmérsékleten, kényszerített levegőztetés körülményei között (0,5–1 l/perc) inkubálják, hogy az oldott oxigén koncentrációja a 60–70 %-os telítettség felett maradjon, illetve hogy az iszappelyheket szuszpenzióban tartsák. A kultúrák keverése is szükséges, hogy az iszappelyheket szuszpenzióban lehessen tartani. Az inkubáció kezdetének azt a pillanatot tekintik, amikor az eleveniszap-oltóanyag először lép érintkezésbe a végső keverék többi alkotóelemével. Az inkubálás végén, az általában 3 órában meghatározott expozíciós idő eltelte után mintákat vesznek, hogy az e célra tervezett cellában (3. függelék 2. ábra) vagy egy teljesen teletöltött BOD-palackban megmérjék az oldott oxigén koncentrációjának csökkenését. Az inkubáció megkezdésének módja az oxigénfogyasztás mérésére használt berendezés kapacitásától is függ. Ha például csak egyetlen oxigénszondából áll, a méréseket egyedileg végzik el. Ebben az esetben a szintetikus szennyvízzel végzett vizsgálathoz szükséges különböző keverékeket el kell készíteni, de az oltóanyagot vissza kell tartani, és az iszap szükséges mennyiségeit kell hozzáadni a sorozat egyes edényeihez. Az inkubációkat kényelmes időközönként, pl. 10–15 percenként kell elkezdeni. Más esetben a mérési rendszer több szondából is állhat, ami több egyidejű mérést tesz lehetővé; ebben az esetben az oltóanyagot egyidőben is hozzá lehet adni a megfelelő edénycsoportokhoz.

37. Az eleveniszap koncentrációja minden vizsgált, referencia és vak keverékben (de nem abiotikus kontrollban) névlegesen 1,5 g/l szuszpendált szilárd anyag. Az oxigénfogyasztást a 3 órás expozíció után kell megmérni. További 30 perces expozíciós méréseket kell végezni szükség esetén az 5. pontban leírt módon.

Az iszap nitrifikációs potenciálja

38. Annak eldöntésére, hogy az iszap nitrifikál-e, és ha igen, milyen ütemben, a vak kontrollnak megfelelő keverékeket (F_B) és további „kontroll” keverékeket (F_N) kell készíteni, amelyek 11,6 mg/l N-allil-tiokarbamidot is tartalmaznak.

▼M6

A keverékeket levegőztetni és 20° ± 2 °C-on 3 órán át inkubálni kell. Ezután meg kell mérni az oxigénfelvétel sebességét, és ki kell számítani a nitrifikáció miatti oxigénfelvétel mértékét.

A vizsgálat megtervezése

Dózisbehatároló vizsgálat

39. Szükség esetén előzetes vizsgálatot kell végezni, hogy megbecsüljék a vizsgált vegyi anyagnak az oxigénfogyasztás gátlásának meghatározására szolgáló meghatározó vizsgálathoz szükséges koncentrációját. Az oxigénfogyasztás vizsgált vegyi anyag által okozott gátlásának előzetes vizsgálatban megfigyelt hiánya azt jelezheti, hogy a meghatározó vizsgálatra nincs szükség, de a vizsgálatba be kell vonni az előzetes vizsgálatban vizsgált legmagasabb koncentráció (jellemzően 1 000 mg/l, de függ az adatokra vonatkozó követelménytől) háromszorosát.

1. táblázat

Példák az előzetes vizsgálatban használt keverékekre

Reagens	Eredeti koncentráció				
A vizsgált vegyi anyag törzsoldata	10 g/l				
A szintetikus közeg törzsoldata	Lásd a 16. pontot				
Eleveniszap törzsszuszpenzió	3 g/l szuszpendált szilárd anyag				
A keverékek összetevői	Adagolás a vizsgálati edényekbe [a]				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
A vizsgált vegyi anyag törzsoldata (ml) (19–21. pont)	0,5	5	50	0	50
A szintetikus szennyvíz tápszer törzsoldata (ml) (16. pont)	16	16	16	16	16
Eleveniszap-szuszpenzió (ml) (26–29. bekezdés)	250	250	250	250	0
Víz (15. pont)	233,5	229	184	234	434
A keverékek összes térfogata (ml)	500	500	500	500	500
Koncentrációk a keverékben					
Vizsgálati szuszpenzió (mg/l) Eleveniszap	10	10	1 000	0	1 000
(szuszpendált szilárd anyagok) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

[a] (Ugyanezt az eljárást kell követni a referencia-vegyianyag esetében, hogy megkapjuk az F_{R1-3} lombikot

40. A vizsgálatot a vizsgált vegyi anyag legalább három koncentrációjával (például 10 mg/l, 100 mg/l és 1 000 mg/l) és egy vak kontrollal kell elvégezni, illetve szükség esetén a vizsgált vegyi anyag legmagasabb koncentrációját tartalmazó legalább három abiotikus kontrollal (példaként lásd az 1. táblázatot). Ideális esetben a legalacsonyabb koncentráció nem lehet hatással a

▼M6

oxigénfogyasztásra. Ki kell számítani az oxigénfelvétel sebességét és, ha lényeges, a nitrifikáció sebességét; ezt követően pedig ki kell számítani a százalékos gátlást. A vizsgálat céljától függően az is lehetséges, hogy egyszerűen meghatározzák a határérték koncentráció (pl. 1 000 mg/l) toxicitását. Ha ezen a koncentráción nem lép fel statisztikailag szignifikáns toxikus hatás, nincs szükség magasabb vagy alacsonyabb koncentrációkon végzett további vizsgálatokra. Meg kell jegyezni, hogy a vízben rosszul oldódó anyagokat, a különböző vízoldhatóságú komponensek keverékeit és az adszorbeáló anyagokat közvetlenül kell bemérni a kísérleti edényekbe. Ebben az esetben a vizsgált anyag törzsoldata számára fenntartott térfogatot hígító vízre kell cserélni.

Meghatározó vizsgálat

A teljes oxigénfelvétel gátlása

41. A vizsgálatot az előzetes vizsgálatból levezethető koncentrációtartományban kell elvégezni. A NOEC és az EC_x (pl. EC_{50}) megállapítása érdekében a legtöbb esetben hat kontroll, egy mértani sorozatot alkotó öt kezelési koncentráció, illetve öt ismétlés ajánlott. Az abiotikus kontrollt nem kell megismételni, ha nem volt oxigénfelvétel az előzetes vizsgálat során, de ha jelentős mértékű felvétel történik, abiotikus kontrollokat kell alkalmazni a vizsgált vegyi anyag minden egyes koncentrációjához. Az iszap érzékenységét a 3,5-diklór-fenol referencia-vegyianyag alkalmazásával kell ellenőrizni. Az iszap érzékenységét minden vizsgálati sorozat esetében ellenőrizni kell, hiszen az érzékenység köztudottan fluktuál. Minden esetben mintákat vesznek a kísérleti edényből 3 óra elteltével, és ezen felül 30 perc múlva, ha szükséges, hogy megmérjék az oxigénfelvétel sebességét az oxigén-elektróda cellában. Az összegyűjtött adatokból kiszámítják a kontroll és vizsgálati keverékek specifikus légzési sebességét; a százalékos gátlást ezt követően az alábbi 7. egyenletből vezetik le.

A heterotróf légzés és a nitrifikáció gátlásának megkülönböztetése

42. A nitrifikáció specifikus inhibitorának (ATU) használata lehetővé teszi, hogy közvetlenül értékeljék a vizsgált vegyi anyagoknak a heterotróf oxidációt gátló hatását, és az oxigénfelvétel ATU jelenlétében mért sebességét kivonva a teljes felvételi sebességből (ATU nincs jelen) ki lehet kiszámítani a nitrifikáció sebességére gyakorolt hatást. Két sorozat reakciókeveréket kell készíteni a 41. pontban leírt EC_x vagy NOEC vizsgálat elrendezés szerint, de emellett ATU-t kell hozzáadni az egyik sorozat minden egyes keverékéhez 11,6 mg/l végső koncentrációban, amelyről kimutatták, hogy teljes mértékben gátolja a legfeljebb 3 000 mg/l szuszpendált szilárd anyag koncentrációjú iszap nitrifikációját (4). Az oxigénfelvétel sebességét az expozíciós idő eltelte után kell mérni; ezek a közvetlen értékek csak a heterotróf légzést reprezentálják, és az ezek és a hozzájuk tartozó teljes légzési sebességek különbsége reprezentálja a nitrifikációt. A gátlás különböző mértékeit ezt követően számítják ki.

Mérések

43. Az expozíciós idő(k) eltelte után az első levegőztető edényből át kell transzferálni egy mintát az oxigén-elektród cellába (2. függelék 1. ábra), és az oldott oxigén koncentrációját azonnal meg kell mérni. Ha több elektródát tartalmazó rendszer áll rendelkezésre, akkor a mérések végezhetők egyidejűleg is. A keverés (bevont mágnes útján) alapvető fontosságú és ugyanolyan sebességen kell történnie, mint amelyet az elektróda kalibrálásakor alkalmaztak. Ez biztosítja, hogy a szonda minimális késéssel válaszoljon a

▼M6

változó oxigén koncentrációkra, és ez teszi lehetővé a rendszeres és reprodukálható oxigénmérések végzését a mérőedényben. Általában az egyes oxigén-elektródák önkeverő szondarendszere megfelelő. A cellát a mérések között vízzel ki kell öblíteni. Alternatív megoldásként a mintát egy mágneses keverővel ellátott BOD-palack megtöltésére is lehet használni (3. függelék 2. ábra). Egy hüvely adapterrel ellátott oxigénszondát kell ezután beilleszteni a palack nyakába, és a mágneses keverőt el kell indítani. Mindkét esetben folyamatosan kell mérni és regisztrálni az oldott oxigén koncentrációját egy adott ideig, rendszerint 5–10 percig, vagy amíg az oxigénkoncentráció 2 mg/l alá nem csökken. Az elektródát el kell távolítani, a keveréket pedig vissza kell juttatni a levegőztető edénybe és folytatni kell levegőztetést és a keverést, ha hosszabb expozíciós időszakok utáni mérésekre is szükség van.

A vizsgált vegyi anyag koncentrációjának ellenőrzése

44. Bizonyos esetekben szükség lehet arra, hogy megmérjék a vizsgált vegyi anyag koncentrációját a vizsgálati edényben. Meg kell jegyezni, hogy ha

— vízben rosszul oldódó anyagokból,

— különböző vízoldhatóságú összetevők keverékéből, vagy

— vízben jól oldódó anyagokból, de ahol a törzsoldat koncentrációja a közel van a maximális vízoldhatósághoz,

készített törzsoldatokat használnak, az oldott frakció ismeretlen, és a vizsgált vegyi anyagnak a vizsgálati edénybe transzferált valódi koncentrációja nem ismert. Az expozíció jellemzése érdekében szükség van a vizsgált vegyi anyag vizsgálati edényben elért koncentrációjának analitikus becslésére. Az egyszerűség kedvéért az analitikus becslést az oltóanyag hozzáadása előtt kell elvégezni. Annak a ténynek köszönhetően, hogy csak oldott frakciók kerülnek át a vizsgálati edényekbe, a mért koncentrációk nagyon alacsonyak lehetnek.

45. Az időigényes és drága analízisek elkerülése érdekében ajánlott a vizsgált vegyi anyagot egyszerűen közvetlenül a vizsgálati edényekbe bemérni, és a későbbi számítások során a kezdeti bemért névleges koncentrációra hivatkozni. A vizsgált vegyi anyag oldott, nem oldott vagy adszorbeált frakciói közötti különbségtételre nincs szükség, mert ezek a frakciók valós körülmények között, a szennyvízkezelő üzemben is megjelennek, és a frakciók a szennyvíz összetételétől függően eltérőek lehetnek. A vizsgálati módszer célja a nem gátló koncentráció reális becslése, és nem alkalmas annak részletes vizsgálatára, hogy mely frakciók járulnak hozzá az eleveniszapban található organizmusok gátlásához. Végezetül az adszorbens anyagokat is közvetlenül a vizsgálati edényekbe kell bemérni, és az edényeket az adszorpció okozta veszteségek minimalizálása érdekében szilanizálni kell.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az oxigénfelvételi sebességek kiszámítása

46. Az oxigénfelvételi sebességet az átlagos mért értékekből kell kiszámítani, pl. az oxigénkoncentrációt az idő függvényében ábrázoló grafikonok lineáris részéből, a számításokat a 2,0 mg/l és 7,0 mg/l közötti oxigénkoncentrációkra korlátozva, mivel a magasabb és az alacsonyabb koncentrációk maguk

▼**M6**

is befolyásolhatják a fogyasztás sebességét. Az ezen értékek alatti vagy feletti koncentrációsávokba történő kiterjesztés alkalmanként elkerülhetetlen és szükséges, például, ha a légzés erősen elnyomott, és ennek következtében nagyon lassú, vagy ha egy adott eleveniszap nagyon gyorsan lélegzik. Ez elfogadható, feltéve, hogy az oxigénfelvételi grafikon kiterjesztett szakaszai egyenesek és a gradiensei nem változnak, miközben áthaladnak a 2,0 mg/l vagy a 7,0 mg/l O_2-határokon. A grafikon ívelt szakaszai azt jelzik, hogy a mérési rendszer stabilizálódik, vagy a felvételi sebesség változik, és ezeket nem szabad a légzés sebességének kiszámításához használni. Az oxigénfelvétel sebességét milligramm per liter per óra (mg/lh) vagy milligramm per gramm száraz iszap per óra (mg/gh) mértékegységben kell megadni. Az oxigénfogyasztás mértékét (R, mg/lh mértékegységben) a felvett oxigéncsökkenési grafikon lineáris részéből lehet kiszámítani vagy interpolálni az 1. egyenlet szerint:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad (1)$$

ahol:

Q_1 oxigénkoncentráció a lineáris fázis kiválasztott szakaszának elején (mg/l);

Q_2 oxigénkoncentráció a lineáris fázis kiválasztott szakaszának végén (mg/l);

Δ_t időintervallum a két mérés között (perc).

47. A fajlagos légzési sebességet (R_s) az iszap egy gramm száraz tömege által óránként elfogyasztott oxigén mennyiségében (mg/gh) fejezik ki a 2. egyenlet szerint:

$$R_s = R/SS \qquad (2)$$

ahol SS a szuszpendált szilárd anyag koncentrációja a vizsgálati keverékben (g/l).

48. Az R különböző kombinálható indexei a következők:

S specifikus sebesség

T teljes légzés sebessége

N nitrifikációs légzés miatti sebesség

H heterotróf légzés miatti sebesség

A abiotikus folyamatok miatti sebesség

B sebesség a vak vizsgálatok alapján (átlag)

A nitrifikáció miatti oxigénfelvétel sebességének kiszámítása

49. A teljes légzés (R_T), a nitrifikációs légzés (R_N), és a heterotróf légzés (R_H) közötti összefüggést a 3. egyenlet adja meg:

$$R_N = R_T - R_H \qquad (3)$$

ahol:

R_N a nitrifikáció miatti oxigénfelvétel sebessége (mg/lh);

R_T a vak kontroll oxigénfelvételének mért sebessége (ATU nélkül; F_B) (mg/lh).

R_H a vak kontroll oxigénfelvételének mért sebessége hozzáadott ATU-val (F_N) (mg/lh).

▼M6

50. Ez az összefüggés a vakértékekre (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), az abiotikus kontrollokra (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) és a vizsgált vegyi anyagokkal végzett vizsgálatokra (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/gh) érvényes. A specifikus légzési sebesség kiszámítása:

$$R_{NS} = R_N/SS \qquad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \qquad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \qquad (6)$$

51. Ha az előzetes vizsgálat során az R_N nem szignifikáns (pl. az $R_T < 5$ %-a a vak kontrollokban), abból kell kiindulni, hogy a heterotróf oxigénfelvétel megegyezik a teljes felvétellel, és hogy nitrifikáció nem zajlik. Alternatív eleveniszap forrásra lenne szükség, ha a vizsgálatoknak figyelembe kellene venniük a heterotróf és nitrifikáló mikroorganizmusokra gyakorolt hatásokat. Meghatározó vizsgálatot végeznek, ha nyomott oxigénfelvételi sebességre utaló bizonyítékok adódnak a vizsgálati vegyi anyag különböző koncentrációival.

A százalékos gátlás kiszámítása

52. A teljes oxigénfogyasztás százalékos gátlását (I_T) a vizsgált vegyi anyag egyes koncentrációinál a 7. egyenlet adja meg:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \qquad (7)$$

53. Hasonlóképpen, a heterotróf oxigénfelvétel százalékos gátlását (I_H) a vizsgált vegyi anyag egyes koncentrációinál a 8. egyenlet adja meg:

$$I_H = [1-(R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100\ \% \qquad (8)$$

54. Végezetül, az oxigénfelvétel nitrifikáció miatti gátlását (I_N) az egyes koncentrációknál a 9. egyenlet adja meg:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\ \% \qquad (9)$$

55. Az oxigénfelvétel százalékos gátlását a vizsgált vegyi anyag koncentrációja logaritmusának függvényében kell ábrázolni (gátlási görbe, lásd a 4. függelék 3. ábráját). A gátlási görbét minden egyes 3 órás levegőztetési periódus esetében felrajzolják, illetve kiegészítésképpen 30 perc után is. A vizsgált vegyi anyag azon koncentrációját, amely az oxigén felvételét 50 %-kal gátolja (EC_{50}), a grafikonból kell kiszámítani vagy interpolálni. Ha megfelelő adatok állnak rendelkezésre, az EC_{50} 95 %-os megbízhatósági határait, a görbe lejtését, a gátlás kezdetét jelölő megfelelő értékeket (például EC_{10} vagy EC_{20}), és a gátlási tartomány a végét (például EC_{80} vagy EC_{90}) ki lehet számítani vagy interpolálni lehet.

56. Meg kell jegyezni, hogy tekintettel az eredmények gyakran megfigyelt variabilitására, sok esetben elegendő lehet az eredményeket nagyságrendileg kifejezni, például:

EC_{50} <1 mg/l

EC_{50} 1-10 mg/l

EC_{50} 10-100 mg/l

EC_{50} > 100mg/l

Az eredmények értelmezése

EC_x

▼M6

57. Az EC_x-értékeket, beleértve a hozzájuk tartozó alsó és felső 95 %-os megbízhatósági határokat, megfelelő statisztikai módszerekkel számítják ki (pl. probit analízis, logisztikai vagy Weibull funkció, vágott Spearman-Karber módszer vagy egyszerű interpoláció (11)). Az EC_x-értéket úgy kapják meg, hogy a kapott egyenletbe beillesztenek egy értéket, amely megfelel a kontroll átlaga x %-ának. Az EC_{50} vagy bármely más EC_x kiszámításához a kezelésenkénti átlagokat (x) regressziós elemzésnek kell alávetni.

A NOEC becslése

58. Ha a statisztikai elemzés célja a NOEC meghatározása, edényenkénti statisztikákra (az egyes edények ismétlésnek minősülnek) van szükség. Az Aktuális megközelítések a ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató című OECD-dokumentum szerinti megfelelő statisztikai módszereket kell alkalmazni (11). Általában a vizsgált vegyi anyag káros hatásait a kontrollal összehasonlítva egyoldali (kisebb) hipotézisvizsgálattal ($p \leq 0{,}05$) vizsgálják.

Vizsgálati jegyzőkönyv

59. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag

— közös név, kémiai név, CAS-szám, tisztaság;

— a vizsgált vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságai (pl. log K_{ow}, vízoldhatóság, gőznyomás, Henry-állandó (H), valamint a vizsgált anyag sorsára vonatkozó esetleges információk, pl. eleveniszapos adszorpció);

Kísérleti rendszer

— forrás, a szennyvíztisztító telep működésének feltételei és a kapott befolyó anyag, koncentráció, az eleveniszap előkezelése és fenntartása;

Vizsgálati körülmények

— vizsgálati hőmérséklet, pH a vizsgálat alatt és az expozíció időtartama, fázis(ok);

Eredmények

— a kontrollok fajlagos oxigénfogyasztása (mg O_2/(g iszap × h);

— mért adatok, gátlási görbe (görbék), az EC50 számítási módszere;

— EC_{50}, és ha lehetséges, a 95 %-os megbízhatósági határok, esetleg EC_{20}, EC_{80}; esetleg NOEC és az alkalmazott statisztikai módszerek, ha az EC_{50}-et nem lehet meghatározni;

— a teljes, és ha szükséges, a heterotróf és a nitrifikációs gátlás eredményei;

— a fizikai-kémiai kontroll abiotikus oxigénfelvétele (ha van);

— a referencia-vegyianyag neve és az ezzel a vegyi anyaggal kapott eredmények;

— minden megfigyelés és minden eltérés a vizsgálati módszertől, amely az eredményeket befolyásolhatta.

IRODALOM

(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 Vízminőség. Az eleveniszap oxigénfogyasztás-gátlásának vizsgálata szén- és ammóniumoxidációval, Nemzetközi Szabványügyi Szervezet.

(5) Bealing, D. J. (2003). ISO/TC147/WGI/N.183 dokumentum, Nemzetközi Szabványügyi Szervezet.

(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 Vízminőség. Útmutató a vízben rosszul oldódó szerves vegyületek előkészítésére és kezelésére azok vizes közegben való biológiai lebonthatóságának értékeléséhez, Nemzetközi Szabványügyi Szervezet.

(11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

▼**M6**

1. függelék

Fogalommeghatározások

E vizsgálati módszerben a következő fogalommeghatározások alkalmazandók:

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

EC_X (hatáskoncentráció x % hatás eléréséhez): az a koncentráció, amely valamely hatás x %-át okozza a vizsgálati szervezetekben egy adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva. Például az EC_{50} az a becsült koncentráció, amely a vizsgálat valamilyen végpontja tekintetében a kitett populáció 50 %-ában okoz hatást a meghatározott expozíciós idő alatt.

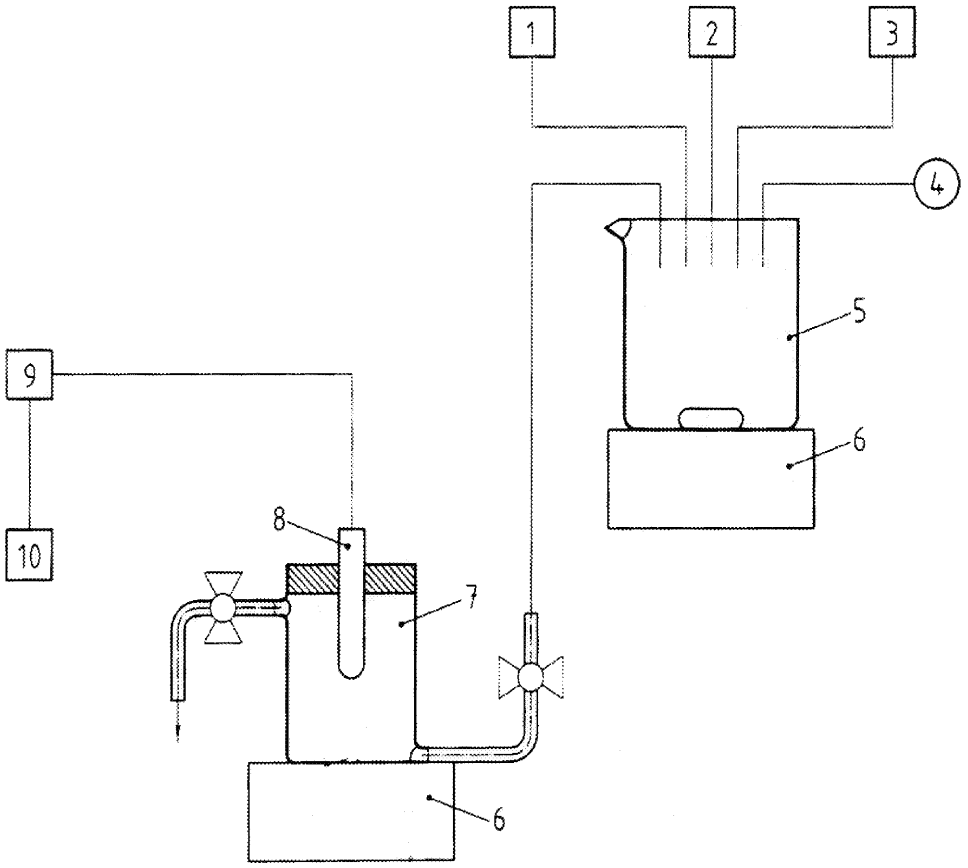
NOEC (észlelhető hatást még nem okozó koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon koncentrációja, amelyen nem figyelhető meg hatás. Ebben a vizsgálatban a NOEC-nek megfelelő koncentrációnak nincs statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$) az adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva.

Vizsgált vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszerrel vizsgált anyag vagy keverék.

▼**M6**

2. függelék

1. ábra: **Példa mérőegységre**



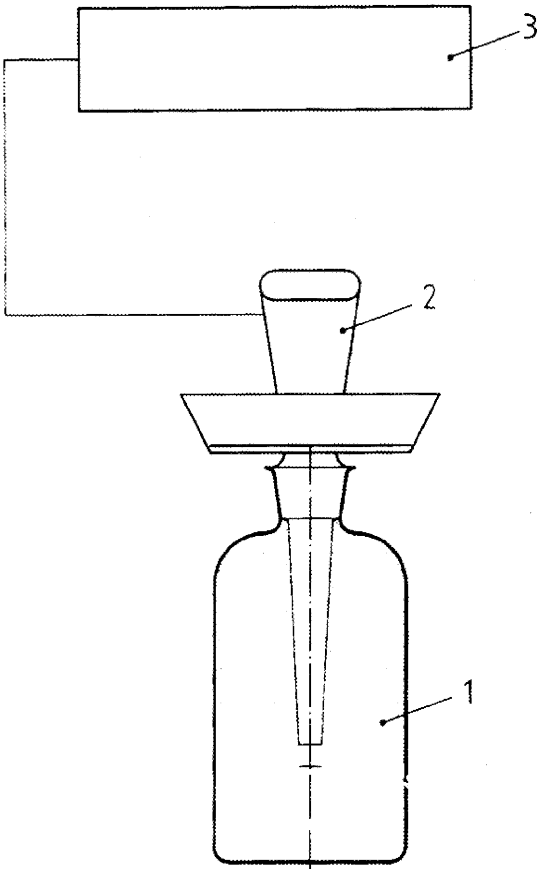
Jelmagyarázat

1 eleveniszap	6 mágneses keverő
2 szintetikus közeg	7 oxigénmérő cella
3 vizsgált vegyi anyag	8 oxigén-elektród
4 levegő	9 oxigénmérő műszer
5 keverőedény	10 felvevő

▼**M6**

3. függelék

2. ábra: **Példa mérőegységre, BOD-palackkal**



Jelmagyarázat

1 Vizsgálati edény

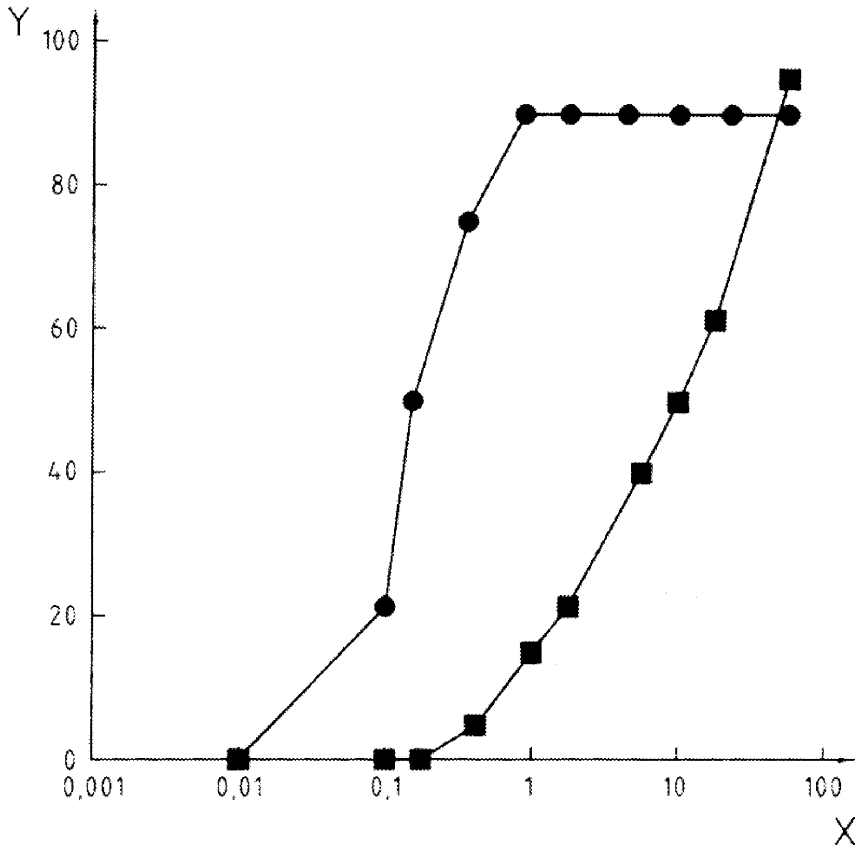
2 oxigénelektród

3 oxigénmérő műszer

▼**M6**

4. függelék

3. ábra: **Példa gátlási görbére**



Jelmagyarázat

X a 3,5-diklór-fenol koncentrációja (mg/l)

Y gátlás (%)

■ a heterotróf légzés gátlása nitrifikáló iszap használata esetén

● a nitrifikáció gátlása nitrifikáló iszap használata esetén.

▼B

C.12. **BIOLÓGIAI LEBOMLÁS**

MÓDOSÍTOTT SCAS-VIZSGÁLAT

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

E módszernek az a célja, hogy felmérje a vízoldékony, nem illékony szerves anyagok végső biológiai lebontásának lehetőségeit akkor, ha azok statikus vizsgálati körülmények között nagy töménységű mikroorganizmusnak vannak kitéve. A mikroorganizmusok életképességét ezen időszak alatt ülepítettszennyvíz-tápoldat naponkénti hozzáadásával lehet fenntartani. (A hétvégi követelményekhez a szennyvizet 4 ^{o}C-os hőmérsékleten lehet tárolni. Másik megoldásként az OECD-megerősítési vizsgálat szintetikus szennyvizét is felhasználhatják.)

A szuszpendált szilárd részecskéken fizikokémiai adszorpció is létrejöhet, amit az eredmények értékelésekor figyelembe kell venni (lásd a 3.2. pontot).

A folyadékfázis hosszú visszatartási ideje (36 óra), valamint a tápanyagok szakaszos hozzáadása miatt a vizsgálat nem teljesen szimulálja a szennyvíztisztító telepen tapasztalható viszonyokat. A különféle vizsgált anyagokkal nyert eredmények azt jelzik, hogy a vizsgálati módszernek igen nagy a biológiai lebonthatósági potenciálja.

A vizsgálathoz előírt feltételek igen kedvezőek a vizsgált anyag lebontására képes mikroorganizmusok szelekciójához és/vagy adaptációjához. (Az eljárást más vizsgálatokhoz szükséges akklimatizált inokulum előállítására is felhasználhatják.)

E módszerben az oldott szerves szén koncentrációjának mérését használják a vizsgált anyag teljes biológiai lebonthatóságának meghatározására. A DOC-értéket kedvezőbb savanyítás és átszűrés után meghatározni, nem pedig a $C_{összes} - C_{szervetlen}$ különbségének értékeként.

A fenti módszer mellett párhuzamosan alkalmazott specifikus analitikai módszer segíthet az anyag primer lebomlásának értékelésében (a kiindulási molekulaszerkezet eltűnése).

A módszer csak olyan szerves vizsgált anyagokra megfelelő, amelyek(nek) a kísérletben használt koncentrációban:

— a vizsgálati körülmények között vízben oldódnak (literenként legalább 20 mg oldott szerves szén),

— páranyomása elhanyagolható,

— a baktériumokat nem gátolják,

— a vizsgálati rendszerben jelentős mértékben nem adszorbeálódnak,

— habképződés útján nem tűnnek el a vizsgált oldatból.

Meg kell határozni a vizsgált anyag szervesszén-tartalmát.

▼B

A vizsgált anyag főbb összetevői egymáshoz viszonyított részarányának ismerete hasznos lehet a kapott eredmények értékelése során, különösen azon esetekben, amikor az eredmények alacsony számértékűek vagy marginálisak.

Az anyag mikroorganizmusokra gyakorolt mérgező hatásának ismerete kívánatos az alacsony számértékű eredmények értékelésénél és a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásánál.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

C_t = a vizsgált anyag koncentrációja szerves szénben kifejezve a levegőztetési időszak kezdetén a szennyvízben jelen lévő, illetve ahhoz hozzáadott állapotban (mg/liter),

C_t = az oldott szerves szén mennyisége a vizsgált anyag felülúszó folyadékában a levegőztetési időszak végén (mg/liter),

C_c = az oldott szerves szén mennyisége a kontroll felülúszó folyadékában a levegőztetési időszak végén (mg/liter).

A biológiai lebonthatóság mértékét e módszerben a szerves szén eltűnésének arányában határozzuk meg. A biológiai lebonthatóságot az alábbiak szerint fejezhetjük ki:

1. A naponta hozzáadott anyag mennyiségére eső D_{da} százalékos eltávolítása:

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \qquad [1]$$

ahol:

D_{da} = biológiai lebonthatóság/napi hozzáadott mennyiség.

2. Az egyes napok kezdetén jelen lévő anyag mennyiségére eső D_{ssd} százalékos eltávolítása:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ (b)]$$

ahol:

D_{ssd} = biológiai lebonthatóság/anyag mennyisége a nap elején;

az i és (i + 1) index a mérés napját jelzi.

A 2(a) képlet alkalmazása akkor ajánlott, ha a kifolyó vízben a DOC naponta változik, míg a 2(b) képletet inkább akkor használhatjuk, ha a kifolyó vízben a DOC viszonylag állandó szinten marad napról napra.

▼B

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Egyes esetekben, ha új anyagokat vizsgálunk, hasznos lehet a referenciaanyagok alkalmazása; konkrét referenciaanyagokat azonban egyelőre nem tudunk ajánlani.

A körvizsgálatban értékelt számos vegyület adatait megadják az 1. függelékben, azért, hogy a módszer kalibrálását időről időre el lehessen végezni, és az eredmények egybevethetőek legyenek akkor is, ha azokat más módszer alkalmazásával nyerték.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ALAPELVE

Szennyvíztisztító telepről származó aktivált iszapot helyeznek egy félig folyamatos aktiváltiszap-egységbe (Semi-Continuous Activated Sladge unit = SCAS). Hozzáadják a vizsgált anyagot és az ülepített kommunális szennyvizet, majd a keveréket 23 órán keresztül levegőztetik. Ezután a levegőztetést leállítják, az iszapot ülepítik, és a felülúszó folyadékot eltávolítják.

A levegőztetőkamrában visszamaradó iszapot a vizsgált anyag és a kommunális szennyvíz további mennyiségével elkeverik, majd a ciklust megismétlik.

A biológiai lebonthatóságot a felülúszóban található oldott szerves szén mennyiségének meghatározásával állapítják meg. Ezt az értéket vetik egybe a csak ülepített szennyvízzel kezelt kontrollcsőben található folyadék hasonló értékével.

Ha specifikus analitikai módszert használunk, mérhető a kiindulási molekula koncentrációjának a biológiai bomlás következtében előállott változása is (elsődleges biológiai bomlás).

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Az oldott szerves szén eltávolításán alapuló módszer reprodukálhatósága még nem került meghatározásra. (Az elsődleges bomlást tekintve, a nagymértékben bomló anyagokról igen pontos adatokat nyerhetünk.)

A módszer érzékenységét nagymértékben a kontrollértékek változékonysága és kisebb mértékben az oldott szerves szén, illetve a vizsgált vegyület folyadékkoncentrációjának az egyes ciklusok elején történő kimutatási pontossága határozza meg.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. *Előkészületek*

Megfelelő mennyiségű tiszta levegőztetőedényt vagy az eredeti 1,5 literes, SCAS-vizsgálathoz használt egységet alkalmazhatják, amelybe beillesztik a levegőbeeresztő csöveket (1. ábra) minden, a vizsgált anyagot tartalmazó, illetve kontrolledény esetében. Vattaszűrőn áteresztett sűrített levegőt vezetnek a vizsgálati egységekbe, amely szerves szenet nem tartalmazhat, és amelyet előzetesen vízzel telíteni kell a párolgási veszteségek csökkentésére.

Literenként 1–4 gramm szuszpendált szilárd részecskét tartalmazó kevert folyadékot szereznek be egy főként kommunális szennyvizet kezelő tisztítóműből. A kevert folyadék mintegy 150 ml-ére van szükség minden egyes levegőztetőegységhez.

▼B

A vizsgált anyag törzsoldatait desztillált vízzel állítják elő; normális esetben a szükséges koncentráció 400 mg szerves szén/liter, ami a vizsgált vegyület 20 mg szén/liter koncentrációját eredményezi minden levegőztetési ciklus elején, ha biológiai bomlás nem történik.

Ennél nagyobb koncentrációk is megengedettek, ha a mikroorganizmusokra gyakorolt toxicitás lehetővé teszi.

A törzsoldat szervesszén-tartalmát meg kell mérni.

1.6.2. *Vizsgálati körülmények*

A vizsgálatot 20–25 °C közötti hőmérsékleten kell elvégezni.

Aerob mikroorganizmusok nagy koncentrációit használják (1–4 g/liter közötti szuszpendáltszilárdrészecske-tartalom), és a tényleges visszatartási idő 36 óra. A hozzáadott szennyvízben található széntartalmú anyagok rendszerint nyolc órával az egyes levegőztetési ciklusok megkezdését követően erőteljesen oxidálódnak. Ezt követően az iszap endogén módon lélegzik a levegőztetési időszak végéig, amely időszak alatt az egyetlen rendelkezésre álló szubsztrátum a vizsgált anyag, hacsak az is nem metabolizálódott. E jellemzők a keverék ismételt napi újraoltásával igen kedvező feltételeket teremtenek olyan esetekben, amikor kommunális szennyvizet használunk tápoldatként, mind az akklimatizáció, mind pedig a nagyfokú biológiai bomlás vizsgálatához.

1.6.3. *A kísérlet végrehajtása*

Kevert folyadékmintát vesznek egy főként háztartási szennyvizet kezelő tisztítóműből vagy laboratóriumi készülékből, és azt a laboratóriumi felhasználásig aerob körülmények között tartják. A kevert folyadékból mintegy 150 ml-t töltenek be minden egyes levegőztetőegységbe, a vizsgált anyagot tartalmazó és a kontrollegységbe egyaránt (ha az eredeti SCAS-egységet használják, az említett mennyiségeket tízzel kell megszorozni), és megkezdik a levegőztetést. 23 óra elteltével a levegőztetést leállítják, és az iszapot 45 percen át ülepítik. Egymás után megnyitják az edények csapjait, és levesznek a felülúszó folyadékból 100 ml-t. Közvetlenül felhasználás előtt mintát vesznek az ülepített kommunális szennyvízből, és ebből 100 ml-t hozzáadnak az egyes levegőztetőegységekben maradt iszaphoz. Ezután ismét elkezdik a levegőztetést. E szakaszban még nem adnak vizsgált anyagot az iszaphoz, és az egységeket naponta táplálják a kommunális szennyvízzel egészen addig, míg az ülepítés után tiszta felülúszó folyadékot nem nyernek. Ez rendszerint legfeljebb két hetet vesz igénybe, amikorra a felülúszó folyadékban található oldott szerves szén mennyisége az egyes ciklusok elején valamely állandó érték felé közelít.

Ezen időszak végén az ülepített iszapokat összekeverik, és az eredményül kapott vegyes iszapból minden egységhez 50 ml-t adnak.

A kontrollegységhez 95 ml ülepített szennyvizet és 5 ml vizet adnak, míg a vizsgálati egységhez 95 ml ülepített szennyvíz mellé 5 ml-t adnak hozzá a vizsgált anyag megfelelő törzsoldatából (400 mg/liter). Ismét megkezdik a levegőztetést, és újabb 23 órán keresztül folytatják. Ezután az iszapot 45 percen át ülepítik, majd a felülúszót leszívják, és meghatározzák az oldottszervesszén-tartalmat.

A fenti feltöltés-leszívás eljárást naponta kell ismételni az egész vizsgálat folyamán.

▼B

Az ülepítés előtt szükség lehet az egység falának megtisztítására, hogy a szilárd részecskék ne gyűljenek össze a folyadék szintje fölött. A (keresztbe) szennyeződés megakadályozása érdekében minden egységnél külön kefét vagy kaparót kell használni.

Ideális esetben az oldott szerves szén mennyiségét a felülúszó folyadékban naponta határozzák meg, ám ennél kevésbé gyakori meghatározás is megengedhető. Elemzés előtt a folyadékot mosott, 0,45 μm-es membránszűrőn átszűrik, és centrifugálják. A membránszűrők akkor megfelelők, ha biztosítható, hogy nem bocsátanak ki szenet, és nem nyelnek el semmit a vizsgált anyagból a szűrés során. A minta hőmérséklete a centrifugában nem haladhatja meg a 40 °C-ot.

A biológiai úton csekély mértékben vagy egyáltalán nem bomló anyagok esetében a vizsgálat ideje meghatározhatatlan, de a tapasztalatok szerint legalább 12 és legfeljebb 26 hétnek kell lennie.

2. ADATOK ES ÉRTÉKELÉS

A vizsgálati egységekben, illetve a kontrollegységekben található felülúszó folyadék oldottszervesszén-mennyiségének értékét ábrázolják az idő függvényében.

A biológiai bomlás folyamatának előrehaladásával a vizsgálati anyagban található szint közelíti a kontrollszintet. Amikor a két szint közötti különbség három egymást követő mérés során állandónak bizonyul, olyan számú további mérést végeznek, amely elegendő a kapott adatok statisztikai feldolgozásához, és kiszámítják a vizsgált anyag százalékos biológiai lebonthatóságát (D_{da} vagy D_{ssd}, lásd az 1.2. pont).

3. JELENTÉS

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— minden információ a használt szennyvíz típusáról, a felhasznált egységről, a vizsgált anyagra vonatkozó vizsgálati eredményekről, a referenciaanyagról – ha volt –, valamint a vakpróbáról,

— hőmérséklet,

— biológiai bomlási görbe, a kiszámítás módjának leírásával (lásd az 1.2. pontot),

— dátum és helyszín, ahonnan a vizsgálati organizmusok mintáját vettük, adaptációs állapotuk, koncentráció stb.,

— a vizsgálati eljárás lépéseiben történt bármely változtatás tudományos okai,

— aláírás és dátum.

▼B

3.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

Miután az ezzel a módszerrel vizsgálandó anyag biológiailag nem könnyen lebontható, a DOC kizárólag biológiai lebonthatóság révén való eltűnése rendes esetben fokozatosan, napok vagy hetek alatt játszódik le, kivéve azon eseteket, amikor a hirtelen akklimatizálódást néhány hét után az anyag átmenet nélküli eltűnése jelzi.

Bizonyos esetekben azonban a fizikokémiai felszívódás fontos szerepet játszhat; ezt az jelzi, ha rögtön az elején teljesen vagy részben eltűnik a hozzáadott DOC. Hogy ezt követően mi történik, az olyan tényezőkön múlik, mint az adszorpció mértéke vagy a szuszpendált szilárd részecskék koncentrációja a kiöntött kifolyó szennyvízben. A kontroll-, illetve a vizsgált anyagot is tartalmazó felülúszó DOC-koncentrációi közötti különbség rendszerint lassan emelkedik az eredeti alacsony értékről, és ez a különbség aztán meg is marad ezen az új értéken a vizsgálat további szakaszaiban, hacsak nem következik be akklimatizáció.

További vizsgálatokra van szükség, ha az adszorpciót és a tényleges (vagy részleges) biológiai bomlást el akarják különíteni. Ezt számos módon el lehet végezni, de a legmeggyőzőbb az, ha a felülúszót vagy az iszapot használják fel inokulumként egy alapbeállító vizsgálathoz (lehetőleg egy légzésmérő vizsgálathoz).

Az olyan típusú vizsgált anyagok, amelyek DOC-értékei ezen vizsgálatban gyorsan és nem felszívódás útján csökkennek, potenciálisan biológiailag lebonthatónak tekinthetők. A részleges és nem felszívódás útján történő csökkenés azt jelzi, hogy a vegyület legalább részben bomlik biológiailag.

Ha a DOC-érték nem vagy csak alig csökken, annak oka lehet az is, hogy a vizsgált anyag gátolja a mikroorganizmusokat, amit az is jelezhet, hogy az iszap szétesik és elvész, zavaros felülúszót eredményezve. Ilyenkor a vizsgálatot a vizsgált anyag alacsonyabb koncentrációjával kell megismételni.

A specifikus analitikai módszerek vagy a ^{14}C izotóppal jelölt vizsgált anyag használata nagyobb érzékenységet tesz lehetővé. Ha ^{14}C izotóppal jelölt vegyületet alkalmaznak, a biológiai bomlás tényét a $^{14}CO_2$ visszanyerési aránya fogja megerősíteni.

Ha az eredményeket elsődleges bomlás formájában is megadják, lehetőség szerint magyarázatot kell fűzni a kémiai szerkezet olyan jellegű változásához, amely a kiindulási vegyület reakciójának elmaradását okozza.

A vak vizsgálati közeg reakciója mellett az analitikai módszer hitelesítését is meg kell adni.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 302. A. vizsgálati irányelv, a Tanács határozata, C(81) 30 végleges.

▼B

1. függelék

SCAS vizsgálat: az eredmény példái

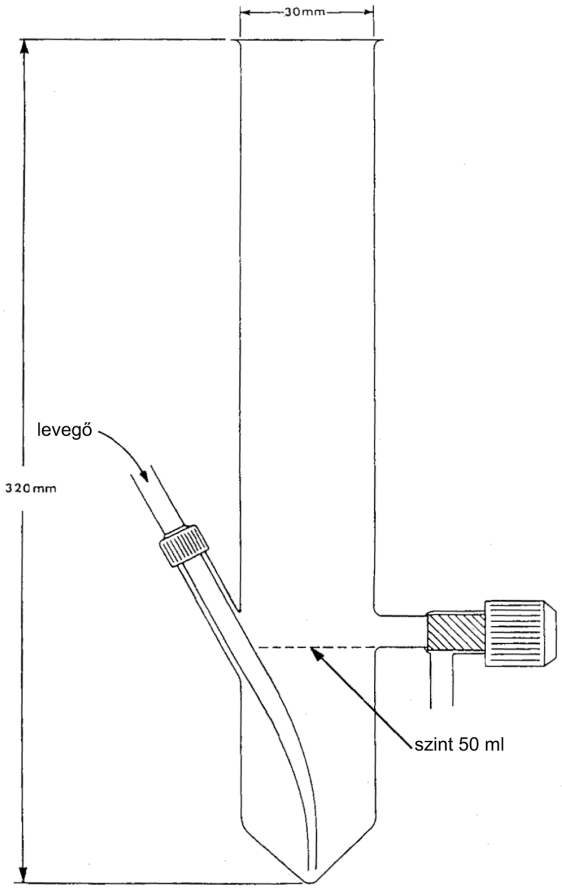
Anyag	C_t (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Százalékos bomlás D_{da}	Vizsgálat időtartama (nap)
4-acetil-aminobenzén-szulfonát	17,2	2,0	85	40
Tetra- propilén-benzol-szulfonát	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Dietilén-glikol	16,5	0,2	98,8	40
Aniline	16,9	1,7	95,9	40
Ciklopentán-tetra-karboxilát	7,9	3,2	81,1	120

▼B

2. Függelék

A vizsgálati berendezés példája

1. ábra



▼M7

C.13. BIOAKKUMULÁCIÓ HALAKBAN: VÍZI VAGY ÉTRENDI EXPOZÍCIÓ

BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 305. vizsgálati iránymutatásában (2012) leírt módszerrel. E vizsgálati módszer felülvizsgálatának kettős célja van: Először is, magában kíván foglalni egy étrendi bioakkumulációs ([1]) vizsgálatot, amely alkalmas arra, hogy meghatározza a nagyon csekély vízoldékonyságú anyagok bioakkumulációs potenciálját. Másodszor szándékolt olyan vizsgálati módszer létrehozása, amely állatjóléti indokból adott esetben kevesebb halat használ fel, és amely költséghatékonyabb.

A C.13. konszolidált vizsgálati módszer (1) elfogadása óta eltelt évek során számos anyag vizsgálatára sor került, és mind a laboratóriumok, mind a szabályozó hatóságok jelentős tapasztalatra tettek szert. Ennek alapján arra a meggyőződésre jutottak, hogy a vizsgálat bonyolultságát mérsékelni lehet bizonyos konkrét kritériumok (vö. 88. pont) teljesülése esetén, és hogy lehetőség van lépcsőzetes megközelítésre. A tapasztalat azt is mutatta, hogy az olyan biológiai tényezők, mint a növekedés és a halak lipidtartalma, jelentősen befolyásolhatják az eredményeket, és azokat esetleg figyelembe kell venni. Ráadásul elismert tény, hogy a vízben nagyon csekély mértékben oldható anyagok vizsgálata a gyakorlatban nem mindig megvalósítható. Emellett vízi környezetben található, nagyon csekély mértékben vízoldékony anyagok tekintetében a vízi expozíció korlátozott jelentőségű lehet az étrendi módszerhez viszonyítva. Ez olyan vizsgálati módszer kialakításához vezetett, ahol a halakra étrendi expozíciót alkalmaznak (vö. 7–14. pont és 97. ponttól). Az étrendi expozíciós vizsgálat validálása (laboratóriumok közötti összehasonlítás) 2010-ben zajlott (51).

A fontosabb változások többek között a következők:

— Elegendőnek tekinthető egyetlen vizsgálati koncentráció tesztelése, ha valószínű, hogy a biokoncentrációs tényező (BCF) független a vizsgálati koncentrációtól.

— Bizonyos kritériumok teljesülése esetén lehetőség van minimális vízi expozíciós vizsgálati tervre is, csökkentett számú mintaponttal.

— A halak lipidtartalmát mérni kell, hogy a BCF-et ki lehessen fejezni 5 %-os lipidtartalom alapján.

— Nagyobb hangsúlyt kap a kinetikus BCF-becslés (ha lehetséges) az állandósult állapoti BCF becslését követően.

— Bizonyos anyagcsoportok esetében az étrendi expozíciós vizsgálat ajánlott, ha azt alkalmasabbnak tekintik a vízi expozíciós vizsgálatnál.

— A halak tömegét mérni kell, hogy a BCF_k-t ki lehessen igazítani a növekedés okozta hígulás tekintetében.

A bioakkumulációs vizsgálatok bármelyikének lefolytatása előtt a vizsgálati anyagról a következőket kell tudni:

(a) A mind a vizsgálati anyag, mind a lehetséges metabolitok szövetekben, vízben vagy tápban meglévő koncentrációinak mérését szolgáló elemzési technika érzékenysége (vö. 65. pont).

(b) Vízoldékonyság [A.6. vizsgálati módszer; (2)]; ezt olyan módszerrel összhangban kell meghatározni, amely a (becsült) oldhatósági tartomány szempontjából megfelelő a megbízható érték megszerzéséhez. A víztaszító anyagok tekintetében ez szokásosan az oszlopelúciós módszer.

([1]) A fogalommeghatározások és mértékegységek tekintetében lásd az 1. függeléket.

▼M7

(c) n-oktanol-víz megoszlási együttható, K_{OW} ([1]) [A.8. (4), A.24. (5), A.23. (6) vizsgálati módszer]; vagy más alkalmas információ a megoszlási viselkedésről (pl. lipidekhez való szorpció, K_{OC}); ezt olyan módszerrel összhangban kell meghatározni, amely a (becsült) K_{OW} tartomány szempontjából megfelelő a megbízható érték megszerzéséhez. A víztaszító anyagok tekintetében ez szokásosan a lassú keveréses módszer [A.23. vizsgálati módszer (6)];

(d) Az anyag stabilitása vízben (hidrolízis [C.7. vizsgálati módszer (7)]);

(e) Az anyag stabilitása a tápban (különösen, ha étrendi expozíciós megközelítést választanak);

(f) A vizsgálat megvilágítási körülményei szempontjából releváns fototranszformációra vonatkozó információ (8);

(g) Felületi feszültség (azaz olyan anyagoknál, ahol a log K_{OW}-t nem lehet meghatározni) [A.5. vizsgálati módszer (9)];

(h) Gőznyomás [A.4. vizsgálati módszer (10)];

(i) A vízben való biológiai vagy abiotikus lebonthatósággal kapcsolatos információ, például (de nem kizárólag) a gyors biológiai lebonthatóság [C.4. vizsgálati módszer, II–VII. rész(11), C.29. vizsgálati módszer (12)], adott esetben;

(j) A metabolitokkal kapcsolatos információ: szerkezet, log K_{OW}, képződés és lebonthatóság, adott esetben;

(k) Sav disszociációs állandó (pK_a) az esetlegesen ionizáló anyagok esetében. Ha szükséges, a vizsgálati víz pH-ját ki kell igazítani annak garantálására, hogy az anyag nem ionizált formában legyen jelen a vizsgálat során, ha ez a halfajjal összeegyeztethető.

A választott expozíciós módszertől vagy mintavételi rendszertől függetlenül ez a vizsgálati módszer az anyagok halakban megjelenő bioakkumulációs potenciáljának jellemzésére szolgáló eljárást írja le. Bár az átfolyásos vizsgálatot előnyben kell részesíteni, félstatikus rendszerek is megengedhetők, feltéve hogy az érvényességi kritériumoknak (vö. 24. és 113. pont) megfelelnek. Az étrendi expozíciós útvonalban nincs szükség átfolyásos rendszerre a vizsgálati anyag vízi koncentrációjának fenntartása érdekében, de segít fenntartani az oldott oxigén koncentrációját és tiszta vizet biztosít, továbbá megszünteti pl. az exkrétumok hatását.

A választott vizsgálati módszertől függetlenül e módszer elegendő részlettel szolgál a vizsgálat kivitelezéséhez, miközben kellő szabadságot enged a kísérleti terv egyes laboratóriumok körülményeihez és a vizsgálati anyagok változó jellemzőihez igazítására. A vízi expozíciós vizsgálat leghatékonyabban 1,5–6,0 log K_{OW} értékkel rendelkező stabil szerves vegyi anyagokra alkalmazható (13), de még alkalmazható erőteljesen víztaszító anyagokra is (amelyek esetében a log $K_{OW} > 6,0$), ha igazolható a vizsgálati anyag stabil és teljesen feloldott koncentrációja a vízben. Ha nem mutatható ki a vizsgálati anyag stabil koncentrációja a vízben, a vizes vizsgálat nem lenne megfelelő, és ezért az anyag halakban történő teszteléséhez az étrendi megközelítésre lesz szükség (jóllehet az étrendi vizsgálat eredményeinek kiértékelése és felhasználása a szabályozói kerettől függ). A kb. 9,0-ig terjedő log K_{OW} értékkel rendelkező szerves vegyi anyagok előzetesen becsült biokoncentrációs tényezője (BCF, illetve néha K_B) a Bintein és társai egyenletével kapható meg (14). A biokoncentrációs tényező (BCF) előzetesen becsült értéke az ilyen erősen víztaszító anyagok esetében feltehetően nagyobb lesz, mint a laboratóriumi kísérletekből várt állandósult állapoti biokoncentrációs tényező (BCF_{SS}) értéke, különösen, ha egyszerű lineáris modellt alkalmaznak az

([1]) Néha P_{OW}-vel is jelölik, amelyet az A.8. vizsgálati módszerben szereplő lombikrázásos módszerrel (4), az A.24. vizsgálati módszer szerinti HPLC-módszerrel (5) vagy az A.23. vizsgálati módszer szerinti lassú keveréses módszerrel (6) határoznak meg. A generátorkolonna módszere alkalmanként használható a log K_{OW} meghatározására. Korlátozott számú tanulmány áll rendelkezésre, amely ezen a technikán alapul, elsődlegesen a klórozott bifenilek és dibenzodioxinok esetében (pl. Li és Doucette, 1993) (3). Az esetlegesen ionizáló anyagok tekintetében a log K_{OW}-nak a nem ionizált formára kell vonatkoznia.

▼M7

előzetes becsléshez. A bioakkumulációs potenciált jellemző paraméterek a felvételi sebességi állandó (k_1), az ürülési sebességi állandó, ideértve a tisztulási sebességi állandót (k_2), az állandósult állapoti biokoncentrációs tényező (BCF_{SS}), a kinetikus biokoncentrációs tényező (BCF_K) és az étrendi biomagnifikációs tényező (BMF) ([1]).

A radioaktívan jelölt vizsgálati anyagok megkönnyíthetik a víz-, táp- és halminták analízisét, és felhasználhatók annak eldöntésére, hogy kell-e metabolit-azonosítást és -számszerűsítést végezni. Amennyiben csak az összes radioaktív maradékot mérték (például égetéssel vagy szövetfeloldással), a BCF vagy a BMF a kiindulási anyagon, bármely visszatartott metaboliton és az asszimilált szénen is alapul. A valamennyi radioaktív maradékon alapuló BCF vagy BMF értékeket ezért nem lehet közvetlenül összehasonlítani egyedül a kiindulási anyag egyedi kémiai analíziséből nyert BCF vagy BMF értékkel. A BCF vagy BMF kiindulási anyagon alapuló meghatározása érdekében a radioaktív jelölésen alapuló vizsgálatok során végzett elemzések előtt szétválasztási eljárásokat, pl. TLC, HPLC vagy GC ([2]) lehet alkalmazni. Szétválasztási módszerek alkalmazása esetén el kell végezni a kiindulási anyag és a megfelelő metabolitok azonosítását és számszerűsítését ([3]) (vö. 65. pont), ha a BCF vagy BMF értéknek a kiindulási anyag halban meglévő koncentrációján és nem az összes radioaktívan jelölt maradékon kell alapulnia. A halakon végzett anyagcsere-vizsgálatot vagy *in vivo* eloszlási vizsgálatot bioakkumuláció-vizsgálattal is lehet kombinálni a szövetekben levő maradékok analízise és azonosítása révén. Az anyagcsere lehetősége megfelelő eszközökkel jelezhető előre (pl. OECD QSAR eszköztár (15) és szabadalmaztatott QSAR programok).

Az azzal kapcsolatos döntést, hogy vízi vagy értrendi expozíciós vizsgálatot végezzenek-e és milyen összeállításban, a 3. pontban felsorolt tényezőkre kell alapozni, a megfelelő szabályozói keretet is figyelembe véve. Például a magas log K_{OW} értékkel rendelkező, de a rendelkezésre álló analitikai módszerek érzékenységének fényében értékelhető vízoldékonyságot mutató anyagok tekintetében elsődlegesen a vízi expozíciós vizsgálatot kell mérlegelni. Lehetséges ugyanakkor, hogy a vízoldékonyságra vonatkozó információ nem meghatározó e víztaszító anyagok esetében, ezért az alkalmazandó vizsgálati módszerrel kapcsolatos döntés meghozatala előtt vizsgálni kell a vízi expozíciós vizsgálatra alkalmas, stabil, mérhető oldott vízi koncentrációk elkészítésének lehetőségét (a stabil emulziók nem megengedettek) (16). Nem lehet pontos, előíró jellegű iránymutatást adni arra vonatkozóan, hogy a vízoldékonyság és az oktanol-víz megoszlási hányados kizárási kritériumai alapján melyik módszert kell alkalmazni, mivel más tényezők (analitikai módszerek, bomlás, adszorpció stb.) észlelhető hatást gyakorolhatnak a módszer alkalmazhatóságára a fent említett okokból. Ugyanakkor az 5 feletti log K_{OW} érték és a ~0,01 – 0,1 mg/l alatti vízoldékonyság kijelöli az anyagok azon tartományát, ahol a vízi expozíció egyre nehézkesebbé válhat.

A vizsgálat megválasztását esetlegesen befolyásoló más tényezőket is mérlegelni kell, beleértve az anyag vizsgálati edényekhez és készülékhez való lehetséges adszorpcióját, a vizes oldatokban való stabilitását szemben a haltápban tapasztalható stabilitásával (17) (18), stb.

Az ilyen gyakorlati szempontokkal kapcsolatos információ elérhető más, lezárt vizes vizsgálatokból. A bioakkumulációs vizsgálatok végrehajtásával kapcsolatos szempontok értékelésére vonatkozó további információ elérhető a szakirodalomban (pl. (19)).

Az olyan anyagok esetében, amelyeknél az oldhatóság vagy a vízben oldott koncentráció fenntartása, illetve e koncentrációk elemzése nem jelent korlátot a

([1]) A fogalommeghatározások és mértékegységek tekintetében lásd az 1. függeléket.
([2]) TLC: vékonyréteg-kromatográfia; HPLC: nagynyomású folyadékkromatográfia; GC: gázkromatográfia
([3]) Bizonyos szabályozói keretrendszerekben a metabolitok analízise adott feltételek teljesülése esetén kötelező lehet (vö. 65. pont).

▼M7

vízi expozíciós módszer megvalósítása számára, az anyagok biokoncentrációs potenciálját lehetőség szerint ezzel a módszerrel kell meghatározni. Mindenesetre ellenőrizni kell, hogy az alkalmazandó vízi expozíciós koncentráció(k) a vizsgálati közegben a vízoldékonyságon belül marad(nak). Az oldott vizsgálati anyag állandó koncentrációinak fenntartására különböző módszerek használhatók, például törzsoldatok vagy passzív adagolási rendszerek (pl. az oszlopelúciós módszer) alkalmazása, ameddig bizonyítható, hogy a koncentráció fenntartható és a vizsgálati közeg nem tér el a 27. pontban ajánlottól.

Az erőteljesen víztaszító anyagok (5 feletti log K_{OW} érték és ~0,01 – 0,1 mg/l alatti vízoldékonyság) esetén a vízi expozíció egyre nehézkesebbé válhat. A korlátok oka lehet, hogy a vízben oldott koncentráció nem tartható fenn egy kellően állandónak tekinthető szinten (pl. az expozíciós tartóedények üvegére való rárakódás vagy a halak általi gyors felvétel miatt), vagy az, hogy az alkalmazandó vízi koncentráció annyira alacsony, hogy az analitikai meghatározási határ tartományába esik, vagy elmarad attól ([1]). E nagymértékben víztaszító anyagok esetében az étrendi vizsgálat ajánlott, feltéve hogy a vizsgálat összhangban van a vonatkozó szabályozói kerettel és a kockázatértékelési igényekkel.

A felületaktív anyagok esetében mérlegelni kell, hogy a vízi biokoncentrációs vizsgálat megvalósítható-e, tekintettel az anyag tulajdonságaira, egyébként az étrendi vizsgálat valószínűleg megfelelőbb. A felületaktív anyagok csökkentik a két folyadék közötti határfelületi feszültséget. Amfifil jellegük miatt (azaz, hogy mind hidrofil, mind víztaszító résszel rendelkeznek) felhalmozódnak olyan határfelületeken, mint a víz-levegő határfelület, a víz-táp határfelület és az üvegfalak, ami megakadályozza ezek vízi koncentrációjának meghatározását.

Az étrendi vizsgálat kiküszöbölheti az expozíciós szempontok némelyikét olyan összetett keverékek esetében, amelyek összetevőinek vízoldékonysági határértékei különböznek, ennyiben a keverék valamennyi alkotóelemének való hasonló expozíció valószínűbb, mint a vizes módszer esetén (vö. (20))

Meg kell jegyezni, hogy az étrendi megközelítés inkább étrendi biomagnifikációs tényezőt és nem biokoncentrációs tényezőt (BCF) ad ([2]). Rendelkezésre állnak megközelítések a kinetikus biokoncentrációs tényező (BCF_K) becslésére az étrendi vizsgálatból nyert adatok alapján (amint azt a 8. függelék ismerteti), ám ezeket fenntartásokkal kell alkalmazni. Ezek a megközelítések elsősorban elsőrendű kinetikát feltételeznek, és csak vegyületek bizonyos csoportjaira alkalmazhatók. Valószínűtlen, hogy ezeket használni lehessen felületaktív anyagok esetében (lásd a 12. pontot).

Az olyan minimalizált vízi expozíciós vizsgálat, amelyet kevesebb mintavételi ponttal építenek fel az állatok számának és/vagy az erőforrásoknak a csökkentése érdekében (vö. a 83. ponttól), csak azokra az anyagokra alkalmazható, amelyek esetében okkal várható, hogy a felvétel és a tisztulás megközelítőleg elsőrendű kinetikát követ (azaz általában nem ionizált szerves anyagok esetében, vö. 88. pont).

C.13. – I: **VÍZI EXPOZÍCIÓN ALAPULÓ BIOKONCENTRÁCIÓS HALVIZSGÁLAT**

A VIZSGÁLAT ELVE

A vizsgálat két fázisból áll: az expozíciós (felvételi) és az expozíció utáni (tisztulási) fázisból. A felvételi fázis alatt az egy fajhoz tartozó halak csoportja a vizsgálati anyag egy vagy több választott koncentrációjával érintkezik, a vizsgálati anyag tulajdonságaitól függően (vö. 49. pont). Ezután átkerülnek a vizsgálati anyagot nem tartalmazó közegbe a tisztulási fázisra. A tisztulási fázis

([1]) Általában a vízben mért koncentrációnak a felvételi fázisban legalább egy nagyságrenddel a meghatározási határ felett kell lennie, hogy a vizsgálat tisztulási fázisában a test anyagterhelésének több mint egy felezési ideje mérhető legyen.

([2]) A fogalommeghatározások és mértékegységek tekintetében lásd az 1. függeléket.

▼M7

mindig szükséges, kivéve, ha az anyag felvétele a felvételi fázis alatt elhanyagolható volt. A vizsgálati anyag koncentrációját a halakban/halakon (vagy meghatározott szövetén/szövetében) a vizsgálat mindkét fázisa alatt figyelemmel kísérik. A kitett csoporton túlmenően, a halak egy kontrollcsoportját azonos körülmények között tartják – leszámítva a vizsgálati anyag hiányát – annak érdekében, hogy a biokoncentrációs vizsgálat során megfigyelt esetleges ártalmas hatások a megfelelő kontrollcsoporthoz legyenek viszonyíthatók, és meghatározhatók legyen a vizsgálati anyag háttér-koncentrációi ([1]).

A vízi expozíciós vizsgálat során a felvételi fázis általában 28 nap. Ez az időtartam szükség esetén meghosszabbítható (vö. 18. pont), vagy lerövidíthető, ha igazolt, hogy az állandósult állapotot korábban elérték (a fogalommeghatározások és mértékegységek tekintetében lásd az 1. függeléket). Az 5. függelék egyenleteivel lehet következtetni a felvételi fázis hosszára és az állandósult állapot eléréséhez szükséges időre. A tisztulási periódus ezután a hal vizsgálati anyagnak való expozíciója megszüntetésével, azaz egy másik tiszta, ugyanolyan közeget, de vizsgálati anyagot nem tartalmazó edénybe való áthelyezésével kezdődik. Amennyiben lehetséges, a biokoncentrációs tényezőt lehetőleg az állandósult állapotban a halban (C_f) és vízben lévő (C_w) koncentráció arányaként (BCF_{SS}; a meghatározást lásd az 1. függelékben), továbbá a felvételi (k_1) és tisztulási (k_2) sebességi állandó hányadosával, elsőrendű kinetikát feltételezve, kinetikus biokoncentrációs tényezőként (BCF_K; a meghatározást és a mértékegységeket lásd az 1. függelékben) kell kiszámítani ([2]).

Amennyiben 28 nap alatt nem áll be az állandósult állapot, a BCF-et vagy kinetikus megközelítés alkalmazásával kell kiszámítani (vö. 38. pont), vagy a felvételi fázist meg kell hosszabbítani. Amennyiben ez megvalósíthatatlanul hosszú felvételi fázishoz vezetne az állandósult állapot eléréséig (vö. 37. és 38. pont, valamint 5. függelék), előnyben kell részesíteni a kinetikus megközelítést. Vagylagosan, nagymértékben víztaszító anyagok esetében az étrendi vizsgálat ajánlott ([3]), feltéve hogy az étrendi vizsgálat összhangban van a vonatkozó szabályozói kerettel.

A felvételi sebességi állandót, a tisztulási (ürülési) sebességi állandót (vagy állandókat, amennyiben összetettebb modellt alkalmaztak), a biokoncentrációs tényezőt (állandósult állapot és/vagy kinetikai), és amennyiben lehetséges, e paraméterek mindegyike esetében a konfidenciahatárokat, a halban és a vízben mért vizsgálatianyag-koncentrációt legjobban leíró modell szerint számítják ki (vö. 5. függelék).

A halak tömegének a vizsgálat során bekövetkező növekedése következtében a fejlődő halakban csökken a vizsgálatianyag-koncentráció (ez az úgynevezett növekedés okozta hígulás), így a kinetikus BCF-et alulbecslik, ha nem korrigálják a növekedés tekintetében (vö. 72. és73. pont).

A BCF a halban megfigyelt teljes koncentráción alapul (azaz teljes nedves tömegének függvényeként fejezik ki). Különleges célokra azonban meghatározott szövetek és szervek (pl. izom, máj) is használhatók, amennyiben a hal elég nagy, illetve ha a hal ehető (filé) és nem ehető (zsiger) részekre osztható. Mivel számos szerves anyagnál egyértelmű kapcsolat van a biokoncentrációs potenciál és a víztaszító képesség között, ezért ugyanilyen kapcsolat van a vizsgálati hal lipidtartalma és az ilyen anyagok megfigyelt biokoncentrációja között is. Ezért a nagy lipofilitású (azaz log K_{OW} > 3) anyagokra kapott vizsgálati

([1]) A legtöbb vizsgálati anyag ideális esetben nem mutatható ki a kontrollvízben. A háttérkoncentráció csak természetes körülmények között előforduló anyagok (pl. egyes fémek), illetve olyan anyagok esetén lehet releváns, amelyek mindenütt megtalálhatók a környezetben.

([2]) Amennyiben az elsőrendű kinetika nyilvánvalóan nem teljesül, összetettebb modelleket kell használni (lásd az 5. függelék hivatkozásait), és biostatisztikus szakvéleményét kell kikérni.

([3]) A felvételt korlátozhatja az alacsony expozíciós koncentráció a biokoncentrációs vizsgálatban alkalmazott alacsony vízoldékonyság miatt, míg sokkal magasabb expozíciós koncentráció érhető el az étrendi vizsgálattal.

▼M7

eredmények variabilitása e forrásának csökkentéséhez a biokoncentrációt 5 %-os lipidtartalmú halra normalizálva kell kifejezni (a teljes nedves testtömeg alapján), a vizsgálatból közvetlenül származtatott lipidtartalmon kívül. Erre azért van szükség, hogy olyan alapot szolgáltassanak, amelyből kiindulva a különböző anyagokkal és/vagy vizsgálati fajokkal kapcsolatos eredmények összevethetők egymással. Az 5 %-os lipidtartalom széles körben alkalmazott, mivel ez az ilyen vizsgálati módszerben általában használt halak átlagos lipidtartalmát jelenti (21).

A VIZSGÁLATI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

A vizsgálati anyag bevezetésben (3. pont) megadott tulajdonságain felül más szükséges információ a vizsgálat során alkalmazandó halfajokra gyakorolt, lehetőleg aszimptotikus LC_{50} (azaz az idő függvényében meghatározott) toxicitás és/vagy a hosszú távú halvizsgálatok (pl. C.47. (22), C.15. (23), C.14. (24) vizsgálati módszer) alapján becsült toxicitás.

Ismert pontosságú és érzékenységű analitikai módszernek kell rendelkezésre állnia a vizsgálati anyag kvantifikálására a vizsgálati oldatokban és a biológiai anyagban, a mintakészítés és tárolás részleteivel együtt. A vizsgálati anyag vízben és halszövetekben érvényes analitikai meghatározási határának is ismertnek kell lennie. Amennyiben radioaktívan jelölt vizsgálati anyagot használnak, annak a legnagyobb tisztaságúnak kell lennie (pl. lehetőség szerint > 98 %), és ismerni kell a szennyeződésekhez tartozó százalékos radioaktivitást.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

A vizsgálat érvényességéhez a következő feltételeknek kell teljesülniük:

A vízhőmérséklet változása kevesebb, mint ± 2 °C, mivel a nagy eltérések befolyásolhatják a felvétel és a tisztulás szempontjából fontos biológiai paramétereket, továbbá stressznek tehetik ki az állatokat.

Az oldott oxigén koncentrációja nem eshet 60 %-os telítettség alá.

A kamrákban a vizsgálati anyag koncentrációját a felvételi fázisban mért értékek átlagának ± 20 %-án belül kell tartani.

A vizsgálati anyag koncentrációja a vízoldékonysági határértékén belül van, figyelembe véve a vizsgálati víz tényleges oldhatóságra gyakorolt hatását ([1]).

A vizsgálat végén a kontroll és a kezelt halak mortalitásának és egyéb káros hatásoknak/betegségeknek 10 %-nál kisebbnek kell lenni; amennyiben a vizsgálat több hétig vagy hónapig tart, a pusztulásnak, vagy más ártalmas hatásnak a halak mindkét csoportjában kisebbnek kell lenni havi 5 %-nál, és összességében nem haladhatja meg a 30 %-ot. Az átlagos növekedésnek a mintába felvett halak vizsgálati és a kontrollcsoportja közötti jelentős különbségei a vizsgálati anyag toxikus hatására utalhatnak.

REFERENCIAANYAGOK

Ismert biokoncentrációs potenciállal és alacsony anyagcserével jellemzett referenciaanyagok alkalmazása hasznos lehet a kísérleti eljárás ellenőrzéséhez, ha erre szükség van (pl. ha a laboratórium nem rendelkezik korábbi tapasztalattal a vizsgálatot érintően, vagy ha a kísérleti körülmények megváltoztak).

([1]) A több összetevőből álló anyagok, UVCB-k és keverékek esetében az egyes releváns összetevők vízoldékonyságát figyelembe kell venni a megfelelő expozíciós koncentrációk meghatározásához.

▼M7

A MÓDSZER ISMERTETÉSE

Felszerelés

A vizsgálat során kerülni kell az olyan anyagok használatát, amelyek oldódhatnak, szorbeálódhatnak vagy kimosódhatnak az eszközökből, és ártalmasak lehetnek a halakra. Szabványos, kémiailag közömbös anyagból készült, a töltési aránynak megfelelő térfogatú négyszögletes vagy hengeres tartályok használhatók (vö. 43. pont). A puha műanyag csövek használatát minimalizálni kell. Politetrafluoretilén, rozsdamentes acél és/vagy üvegcsövek használata ajánlott. A tapasztalatok alapján a nagy adszorpciós együtthatójú vizsgálati anyagok, mint a szintetikus piretroidok esetében szükséges lehet szilanizált üveg használata. Ilyen esetekben a felszerelést használat után el kell dobni. A vizsgálati szervezetek hozzáadása előtt a vizsgálati rendszereket lehetőség szerint annyi ideig kell kitenni a vizsgálati vegyi anyag vizsgálat során alkalmazandó koncentrációinak, amennyi a stabil expozíciós koncentrációk fenntartásának bizonyításához előírt.

Víz

A vizsgálathoz általában természetes vizet kell használni, amely nem szennyezett, és állandó minőségű forrásból származik. Ugyanakkor mesterséges víz (azaz olyan ásványmentesített víz, amelyhez ismert mennyiségben tápanyagot adtak) alkalmasabb lehet az állandó minőség időbeli biztosítására. A hígítóvíz (azaz a vizsgálati anyaggal a vizsgálati edénybe helyezés előtt elkevert víz, vö. 30. pont) minőségének lehetővé kell tennie a választott halfajok túlélését az akklimatizációs és a vizsgálati időszakok alatt anélkül, hogy bármilyen rendellenes külső megjelenés vagy viselkedés jelentkezne. Ideális esetben a vizsgálati fajok bizonyítottan képesek túlélni, fejlődni és szaporodni a hígítóvízben (pl. laboratóriumi tenyészetben, vagy életciklusra vonatkozó toxicitásvizsgálatnál). A vizet legalább a pH-val, keménységgel, valamennyi szilárd anyaggal, teljes szervesszén-tartalommal (TOC ([1])), és lehetőleg ammónium-, nitrittartalommal és alkalitással, továbbá tengeri fajok esetében sótartalommal is jellemezni kell. A halak optimális jólétéhez fontos paraméterek nem teljesen ismertek, de a 2. függelék megadja számos paraméter esetében az ajánlott maximális koncentrációt a vizsgálathoz használt édes- és tengervízre.

A vizsgálati időszak alatt a hígítóvíznek állandó minőségűnek kell lennie. A pH-értékének 6,0 és 8,5 között kell lennie a vizsgálat kezdetekor, de egy adott vizsgálat során ± 0,5 pH egységnyi tartományon belül kell maradnia. Analízis céljából bizonyos időközönként, de legalább a vizsgálat kezdetekor és végén mintákat kell venni annak érdekében, hogy a hígítóvíz ne befolyásolhassa hátrányosan a vizsgálati eredményeket (például a vizsgálati anyag komplexálásával), vagy ne legyen káros hatással a halállomány teljesítményére. Meg kell határozni a következők mennyiségét: a nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd és Ni), a fontosabb anionok és kationok (pl. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, és SO_4^{2-}), a peszticidek (pl. összes szerves foszfor és összes szerves klór tartalmú peszticidek), a teljes szervesszén-tartalom és a szuszpendált szilárd anyagok, például háromhavonta, amennyiben a hígítóvízről tudott, hogy viszonylag állandó minőségű. Amennyiben a hígítóvíz minősége legalább egy éven keresztül állandónak bizonyul, a vizsgálatot ritkábban és nagyobb időközönként is el lehet végezni (pl. minden hat hónapban).

A hígítóvíz természetes részecske- és teljes szervesszén-tartalmának (TOC) is a lehető legalacsonyabbnak kell lenni, hogy a vizsgálati anyag ne adszorbeálódjon szerves anyagon, ami csökkenthetné a biológiai hasznosíthatóságot és egyúttal a BCF alulbecslését eredményezné. A maximális elfogadható érték 5 mg/l szemcsés anyagok esetében (szárazanyag, 0,45 μm-es szűrőn nem jut át) és 2 mg/l a teljes szervesszén-tartalom esetében (vö. 2. függelék). A hígítóvizet szűrni kell

([1]) A TOC tartalmazza a részecskékből származó és az oldott szerves szenet is, azaz TOC = POC + DOC.

▼M7

felhasználás előtt, amennyiben szükséges. A kísérleti halaktól (ürülék) és a tápmaradékból származó szerves széntartalom járulékának a lehető legkisebbnek kell lenni a vizsgálati vízben (vö. 46. pont).

Vizsgálati oldatok

A vizsgálati anyagból megfelelő koncentrációjú törzsoldatot kell készíteni. A törzsoldatot célszerű a vizsgálati anyagnak egyszerűen a hígítóvízbe keverésével vagy összerázással elkészíteni. Egyes esetekben megfelelő alternatíva lehet szilárd fázisú deszorpciós adagolási rendszer. Oldószerek és diszpergálószerek (oldódást segítő szerek) alkalmazása általában nem ajánlott (vö (25)); ugyanakkor ezen anyagok használata elfogadható lehet a megfelelő koncentrációjú törzsoldat létrehozásához, de minden erőfeszítést meg kell tenni az ilyen anyagok használatának minimalizálására, és ezeknek a micellák képződése szempontjából kritikus koncentrációját nem szabad túllépni (ha van ilyen). Alkalmazható oldószer az aceton, az etanol, a metanol, a dimetil-formamid és a trietilén-glikol; a korábban használt diszpergálószerek pedig a Tween 80, a 0,01 %-os metilcellulóz és a HCO-40. A végleges vizsgálati közegben az oldószer koncentrációjának valamennyi kezelés során azonosnak kell lennie (azaz függetlenül a vizsgálati anyag koncentrációjától), és az nem lépheti túl az oldószerre vizsgálati körülmények tekintetében meghatározott toxicitási küszöbértékeket. A legmagasabb szint a 100 mg/l (vagy 0,1 ml/l) koncentráció. Valószínűtlen, hogy a 100 mg/l oldószer-koncentráció jelentősen változtatna a vizsgálati anyag maximális, a közegben elérhető oldott koncentrációján (25). Ismerni kell, hogy az oldószer (a vizsgálati anyaggal együtt) mennyivel járul hozzá a vizsgálati víz teljes szervesszén-tartalmához. A vizsgálat során a vizsgálati edényekben a teljes szervesszén-tartalom nem haladhatja meg a vizsgálati anyagból és, amennyiben alkalmazták, az oldószerből vagy oldódást segítő szerből ([1]) származó szerves szén koncentrációját 10 mg/l-nél nagyobb mértékben (± 20 %). A szervesanyag-tartalom jelentős hatást gyakorolhat a szabadon oldott vizsgálati anyag mennyiségére az átfolyásos halvizsgálatok során, különösen az erősen lipofil anyagok tekintetében. A szilárd fázisú mikroextrakció (vö. 60. pont) fontos információt szolgáltathat a kötött és szabadon oldott vegyületek arányáról; a kettő közül ez utóbbi képviseli vélhetően a biológiailag hasznosítható részt. A vizsgálati anyag koncentrációja el kell maradjon a vizsgálati anyag vizsgálati közegben tapasztalható oldhatósági határértékétől oldószer vagy oldódást segítő szer használata ellenére. Gondosan kell eljárni a biológiailag könnyen lebontható oldószerek használata esetén, mivel átfolyásos vizsgálatokban baktériumnövekedés révén problémát okozhatnak. Ha oldódást segítő szer használata nélkül nem lehetséges törzsoldatot készíteni, meg kell fontolni, hogy az étrendi vizsgálat nem megfelelőbb-e a vízi expozíciós vizsgálattal szemben.

Átfolyásos vizsgálatokban a vizsgálati anyag törzsoldatát folyamatosan adagoló és hígító rendszerre (pl. állandó áramlási sebességet biztosító pumpa, szabályozható hígító rendszer, telítőrendszer) vagy szilárd fázisú deszorpciós adagolási rendszerre van szükség a vizsgálati koncentrációk kísérleti kamrákba juttatásához. Az egyes kamrák esetében lehetőség szerint legalább a napi öt térfogatcserét lehetővé kell tenni. Az átfolyásos mód részesítendő előnyben, de amennyiben nem alkalmazható (pl. ha a vizsgálati szervezetekre károsan hat), félstatikus módszer használható, feltéve hogy az érvényességi kritériumok teljesülnek (vö. 24. pont). A törzsoldatok és a hígítóvíz áramlási sebességét a vizsgálat előtt 48 órával, és azt követően a vizsgálat során legalább naponta ellenőrizni kell. Az ellenőrzés magában foglalja az áramlási sebesség meghatározását az egyes vizsgálati kamrákban, és biztosítja, hogy ne változzon 20 %-nál nagyobb mértékben sem az egyes kamrákban, sem azok között.

([1]) Jóllehet általánosságban nem ajánlott, oldószer vagy oldódást segítő anyag használata esetén az ezen anyagból származó szerves szenet hozzá kell adni a vizsgálati anyagból származó szerves szénhez, hogy értékelni lehessen a vizsgálati edényekben a szervesszén-koncentrációt.

▼M7

A fajok megválasztása

A fajok megválasztásánál fontos követelmény, hogy könnyen és megfelelő méretben elérhetők, és a laboratóriumban kielégítő körülmények között tarthatók legyenek. A halfajok megválasztásának egyéb követelményei közé tartozik a fontosság rekreációs, kereskedelmi, ökológiai szempontból éppúgy, mint az összehasonlítható érzékenység, múltbeli sikeres használat stb. Az ajánlott vizsgálati fajok a 3. függelékben találhatók. Más fajok is használhatók, de a vizsgálati eljárást esetleg át kell dolgozni a megfelelő vizsgálati körülmények biztosításához. Ez esetben a fajok és a kísérleti módszer megválasztásának indoklását fel kell tüntetni a Vizsgálati jegyzőkönyvben. Általánosságban a kisebb halfajok használata lerövidíti az állandósult állapot eléréséhez szükséges időt, de több halra (mintára) lehet szükség a lipidtartalom és a halban található vizsgálatianyag-koncentrációk megfelelő elemzéséhez. Emellett lehetséges, hogy a fiatal és idősebb egyedek közötti, a légzés sebességét és az anyagcserét érintő különbségek gátolhatják a különböző vizsgálatokkal és vizsgálati fajokkal elért eredmények összehasonlítását. Meg kell jegyezni, hogy a halfajok gyors növekedéssel járó (fiatal) életszakaszban történő vizsgálata bonyolíthatja az adatok kiértékelését.

A halak tartása (mind a vízi, mind az étrendi expozíció esetében)

A törzsállományt legalább kéthetes időszakban a vizsgálati hőmérsékleten akklimatizálni kell (vö. 28. pont), és kellő táplálékot kell biztosítani ez idő alatt (vö. 45. pont). Mind a víz, mind az étrend típusának meg kell egyeznie a vizsgálat során használttal.

A 48 órás betelepítési időszak után a mortalitást rögzíteni kell, és az alábbi követelményeket kell alkalmazni:

— amennyiben hét nap alatt a populáció mortalitása 10 %-nál magasabb, az egész állományt ki kell cserélni;

— amennyiben hét nap alatt a populáció mortalitása 5–10 %: ha további hét nap akklimatizációs időszak beiktatása után a mortalitási arány ezt követően is magasabb 5 %-nál – az egész állományt ki kell cserélni;

— amennyiben hét nap alatt a populáció mortalitása 5 %-nál alacsonyabb, az állományt el kell fogadni.

A vizsgálathoz csak láthatóan betegségtől és rendellenességtől mentes halak használhatók. A beteg halakat el kell dobni. A vizsgálatot megelőző két hétben és a vizsgálat alatt a halak nem kaphatnak kezelést betegségre.

A VIZSGÁLAT ELVÉGZÉSE

Elővizsgálat

Hasznos lehet elővizsgálatokat végezni a meghatározó vizsgálat vizsgálati körülményeinek optimalizálására (pl. a vizsgálati anyag koncentrációjának megválasztása, a felvételi és tisztulási fázisok tartama), vagy annak meghatározása érdekében, hogy teljes vizsgálatot kell-e folytatni. Az elővizsgálatot úgy kell kialakítani, hogy be lehessen szerezni a szükséges információt. El lehet dönteni, hogy a BCF megállapításához elegendő-e minimalizált vizsgálat, vagy teljes vizsgálatra van szükség (vö. a minimalizált vizsgálatot ismertető 83–95. pont).

Az expozíció körülményei

A felvételi fázis időtartama

A felvételi fázis időtartamának előrejelzése előzetes tapasztalatból (pl. előző vizsgálatból vagy szerkezetileg rokon anyagot érintő akkumulációs vizsgálatból), vagy bizonyos, a vizsgálati anyag vízoldékonysága, vagy oktanol/víz megoszlási együtthatója ismeretét felhasználó tapasztalati összefüggésekből nyerhető (feltéve, hogy a felvétel első rendű kinetikát követ, vö. 5. függelék).

▼M7

A felvételi fázisnak 28 napig kell tartania, kivéve, ha igazolható, hogy az állandósult állapot korábban kialakult (lásd az 1. függeléket a fogalommeghatározások és mértékegységek tekintetében). Állandósult állapot látható a halban mért vizsgálati anyag (C_f) időfüggő ábráján, amennyiben a görbe párhuzamos az időtengellyel, és a C_f három egymást követő, legalább két nap különbséggel vett mintán alapuló elemzése ± 20 %-on belül van egymáshoz képest, és a C_f jelentős időbeli növekedése nem tapasztalható az első és az utolsó egymást követő elemzés között. Összevont minták analízisénél legalább négy egymást követő analízis szükséges. Olyan vizsgálati anyagoknál, amelyek felvétele lassú, megfelelőbbek a hétnapos időközök. Amennyiben az állandósult állapot nem áll be 28 nap alatt, vagy a BCF-et kell kizárólag a kinetikus megközelítéssel kiszámítani, ami nem függ az állandósult állapot elérésétől, vagy a felvételi fázist kell kiterjeszteni további méréseket végezve, amíg az állandósult állapot beáll, vagy legfeljebb 60 napig. Emellett a felvételi fázis végén a vizsgálati anyag halban lévő koncentrációjának kellően magasnak kell lennie a tisztulási fázisból a k_2 megbízható becslésének garantálása érdekében. Ha 28 nap elteltével nem mutatható ki jelentős felvétel, a vizsgálat leállítható.

A tisztulási fázis időtartama

Az elsőrendű kinetikát követő anyagok esetében a felvételi fázis időtartamának a fele rendszerint elég a test anyagterhelésének megfelelő (pl. 95 %-os) csökkenéséhez (vö. 5. függelék a becslés magyarázatához). Amennyiben a 95 %-os csökkenéshez szükséges idő aránytalanul hosszú, meghaladja például a felvételi fázis hosszának kétszeresét (azaz több mint 56 nap), rövidebb időtartam is alkalmazható (azaz amíg a vizsgálati anyag koncentrációja kisebb lesz az állandósult állapoti koncentráció 10 %-ánál). Az elsőrendű kinetikát eredményező egyrekeszes modellnél összetettebb felvételi és tisztulási fázissal rendelkező anyagoknál azonban hosszabb tisztulási fázisra lehet szükség. Ha ennyire összetett mintázat tapasztalható és/vagy várható, a vizsgálat megfelelő kialakításának biztosítása érdekében ajánlott biostatisztikustól és/vagy farmakokinetikustól szakvéleményt kérni. Meghosszabbított tisztulási időszak esetén a mintába felveendő halak száma korlátokat jelenthet, és a halak közötti növekedésbeli különbségek befolyásolhatják az eredményt. Az időtartamot az a periódus szabhatja meg, amelynek során a halban a vizsgálati anyag koncentrációja az analitikai meghatározási határ fölött marad.

A vizsgálati halak száma

A halak számát vizsgálati koncentrációnként úgy kell kiválasztani, hogy legalább négy hal álljon rendelkezésre minden mintavételi ponton. A halakat csak akkor lehet összevonni, ha az egyedi halvizsgálat nem megvalósítható. Ha a görbeillesztésben (és a származtatott paraméterekben) nagyobb pontosságot kívánnak elérni, vagy ha anyagcsere-vizsgálatra van szükség (pl. a metabolitok és a kiindulási anyag közötti különbségtétel érdekében radioaktívan jelölt vizsgálati anyagok esetén), mintavételi pontonként több halat kell biztosítani. A lipidtartalmat ugyanazon a biológiai anyagon kell meghatározni, mint amit a vizsgálati anyag koncentrációjának meghatározására használtak. Amennyiben ez nem megvalósítható, további halakra lehet szükség (vö. 56–57. pont).

Ha felnőtt (azaz ivarérett) halakat használnak, azok nem lehetnek az ívási időszakban, illetve nem lehetnek olyanok, amelyek a közelmúltban raktak ikrát (azaz már leikrázott halak) akár a vizsgálat előtt, akár annak során. Rögzíteni kell, hogy hímeket vagy nőstényeket, vagy mindkettőt használnak-e a kísérletben. Mindkét ivar használata esetén dokumentálni kell, hogy az expozíció kezdete előtt a két ivar között a növekedés és a lipidtartalom különbsége jelentéktelen; különösen, ha szükséges lehet a hím és nőstény halak egybegyűjtése az anyag kimutatható koncentrációinak és/vagy a lipidtartalom garantálására.

▼M7

Mindegyik vizsgálatban hasonló tömegű halakat kell kiválasztani úgy, hogy a legkisebbek ne legyenek kisebbek a legnagyobb hal tömegének kétharmadánál. Ugyanabba a korcsoportba tartozzanak, és a származásuk is azonos legyen. Mivel a halak tömege és kora jelentős hatással lehet a BCF értékekre (12), ezeket a részleteket pontosan rögzíteni kell. Ajánlott az átlagtömeg becslése érdekében a vizsgálat kezdete előtt röviddel a halállomány egy mintaalcsoportját lemérni (vö. 61. pont).

Betelepítés

A halak méretéhez viszonyítva nagy mennyiségű vizet kell használni annak érdekében, hogy minimalizálni lehessen a vizsgálati vegyület vízben lévő koncentrációjában a vizsgálat kezdetén halak hozzáadásával okozott csökkenést, és hogy elkerülhető legyen az oldott oxigén koncentrációjának csökkenése. Fontos, hogy a betelepítési arány a használt vizsgálati fajnak megfelelő legyen. Minden esetben 0,1–1,0 g hal (nedves tömeg) per liter víz per nap az ajánlott betelepítési arány. Akkor használható nagyobb betelepítési arány, ha igazolt, hogy a vizsgálati anyag megkövetelt koncentrációja ± 20 %-os határon belül tartható, és hogy az oldott oxigén koncentrációja nem esik 60 %-os telítettség alá (vö. 24. pont).

A megfelelő betelepítési rendszerek kiválasztásánál a halfajok természetes élőhelyét figyelembe kell venni. A feneken élő halak például nagyobb alapterületű akváriumot igényelnek ugyanazon víztérfogat esetén, mint a nyílt vízi halfajok.

Etetés

Az akklimatizációs és vizsgálati időszak alatt a halakat megfelelő, ismert lipid- és összfehérje-tartalmú táppal kell etetni, az egészségük megőrzéséhez és a testtömegük fenntartásához elegendő mennyiségben (valamennyi növekedés megengedett). Az alkalmazott fajtól, a kísérleti körülményektől és a tápanyag kalorikus értékétől függően naponta rögzített szinten kell etetni az akklimatizációs és a vizsgálati időszakban (pl. a szivárványos pisztráng esetében a testtömeg megközelítőleg 1–2 %-a naponta). Az etetési arányt úgy kell megválasztani, hogy el lehessen kerülni a gyors növekedést és a lipidtartalom számottevő emelkedését. Azonos etetési arány fenntartása érdekében a táp mennyiségét adott esetben, például hetente újra kell számolni. E számításhoz az egyes vizsgálati kamrákban található halak tömege a kamrából legújabban vett halminta tömegéből becsülhető meg. A kamrában maradó halakat nem kell lemérni.

A vizsgálati kamrákból a maradék tápot és az ürüléket az etetést követően rövid időn belül (30 perc–1 óra) naponta szívócsövön keresztül el kell távolítani. A vizsgálat alatt a kamrákat a lehető legtisztábban kell tartani, hogy a szervesanyag-koncentráció a lehető legkisebb legyen (vö. 29. pont), mivel a szerves szén jelenléte korlátozhatja a vizsgálati anyag biológiai hasznosíthatóságát (12).

Mivel számos táp készül hallisztből, biztosítani kell, hogy a táp ne befolyásolja a vizsgálati eredményeket vagy váltson ki káros hatásokat, pl. abból eredően, hogy növényvédő szereket, nehézfémeket és/vagy magát a vizsgálati anyagot (vagy ezek nyomait) tartalmazza.

Fény és hőmérséklet

12–16 órás megvilágítási idő javasolt, és hőmérsékletnek megfelelőnek (± 2 °C) kell lennie vizsgálati fajok számára (vö. 3. függelék). A megvilágítás típusának és jellemzőinek ismertnek kell lennie. Figyelmet kell fordítani a vizsgálati anyag – a vizsgálat megvilágítási körülményei közötti – lehetséges fototranszformációjára. Megfelelő megvilágítást kell használni, hogy a fény hatására nem természetes bomlástermékek lehetőleg ne keletkezzenek. Néhány esetben megfelelő lehet a 290 nm alatti UV-sugárzást kiszűrő ernyő használata.

▼M7

Vizsgálati koncentrációk

A vizsgálatot eredetileg nem poláris szerves anyagokra tervezték. Az ilyen típusú anyagok esetében a halak egyetlen koncentrációjának való expozíciója elegendő, mivel nem várható koncentrációs hatás, jóllehet a vonatkozó szabályozói keret kétféle koncentrációt is előírhat. Ha e körön kívüli anyagokat vizsgálnak, vagy a koncentrációtól való lehetséges függésre utaló jelek ismertek, a vizsgálatot két vagy több koncentrációval kell lefolytatni. Ha csak egy koncentrációt vizsgálnak, az egy koncentráció alkalmazását indokolni kell (vö. 79. pont). A vizsgálati koncentrációnak emellett olyan alacsonynak kell lennie, ami praktikus vagy gyakorlatilag megvalósítható (azaz nem közel az oldhatósági határhoz).

Egyes esetekben várható, hogy az anyag biokoncentrációja a vízbeli koncentrációtól függ (azaz fémek esetében, ahol a halak általi felvétel legalább részben szabályozott lehet). Ilyen esetben szükséges, hogy legalább két, de inkább több, környezeti szempontból releváns koncentrációt vizsgáljanak (vö. 49. pont). Emellett olyan anyagok esetében, amelyeknél a vizsgálati koncentrációnak gyakorlati okokból az oldhatósági határhoz közel kell lennie, javasolt legalább két koncentráció vizsgálata, mivel ez rálátást biztosíthat az expozíciós koncentrációk megbízhatóságára. A vizsgálati koncentrációk megválasztásába bele kell foglalni a környezeti szempontból reális koncentrációt, illetve az adott értékelés céljából releváns koncentrációt.

A vizsgálati anyag koncentrációját/koncentrációit úgy kell megválasztani, hogy azok a krónikus hatási szintje alatt, vagy az akut aszimptotikus LC_{50}-értékének körülbelül 1 %-a alatt maradjanak egy környezeti szempontból releváns tartományban, és legalább egy nagyságrenddel meg kell haladják az alkalmazott analitikai módszerre vízben jellemző meghatározási határt. A legnagyobb megengedett vizsgálati koncentráció az akut (96 órás)/krónikus LC_{50} aránnyal is meghatározható (néhány anyag esetében a megfelelő arány kb. 3 lehet, de egyes esetekben 100 felett). Amennyiben második koncentrációt is alkalmaznak, azt úgy kell megválasztani, hogy a fenti értéktől 10-es szorzótényezővel különbözzön. Amennyiben ez nem lehetséges a toxicitási kritérium miatt (amely korlátozza a vizsgálati koncentráció felső határát) és az analitikai határérték miatt (amely korlátozza a vizsgálati koncentráció alsó határát), 10-nél kisebb szorzótényező is használható, és fontolóra kell venni radioaktívan jelölt (a legmagasabb, lehetőség szerint > 98 % tisztaságú) vizsgálati anyag használatát. Gondoskodni kell arról, hogy a vizsgálati anyag vizsgálati közegben jellemző oldhatósági határa feletti koncentrációt ne alkalmazzanak.

Kontrollcsoportok

A vizsgálati sorozaton kívül hígítóvizet tartalmazó kontrollt (vö. 30. és 31. pont), és az oldószert tartalmazó kontrollt is be kell állítani.

A vízminőség mérésének gyakorisága

A vizsgálat során mindegyik vizsgálati és kontrolledényben mérni kell az oldottoxigén-koncentrációt, a teljes szervesszén-tartalmat (TOC), a pH-értéket és a hőmérsékletet. A vízkeménységet és a sótartalmat (amennyiben ez mérvadó szempont) mérni kell a kontroll(ok)ban és az egyik edényben. Ha két vagy több koncentrációt vizsgálnak, ezeket a paramétereket a magasabb (vagy a legmagasabb) koncentrációnál kell mérni. Az oldott oxigént és (adott esetben) a sótartalmat legalább háromszor kell mérni a felvételi periódusban – annak elején, közepén és a végén – és egyszer egy héten a tisztulási periódusban. TOC-t a vizsgálat kezdetén (a felvételi fázis előtt 24 és 48 órával) a halak bevitele előtt, és a felvételi és tisztulási fázis alatt pedig legalább hetente egyszer kell mérni. A hőmérsékletet naponta, pH-t a periódusok kezdetén és végén, a keménységet vizsgálatonként egyszer kell mérni és rögzíteni. A hőmérsékletet ajánlott folyamatosan mérni, legalább egy edényben.

▼M7

Hal- és vízmintavételezés és -analízis

Mintavételezési ütemterv

A vizsgálati kamrákból a vizsgálati anyag koncentrációjának meghatározásához a halak bevitele előtt, valamint a felvételi és a tisztulási fázis alatt kell vízmintát venni. Vízmintát a halmintával egy időben, etetés előtt kell venni. A gyakoribb mintavétel hasznos lehet a halak bevitelét követő állandó koncentráció biztosítása érdekében. A felvételi fázis alatt meg kell határozni a vizsgálati anyag koncentrációját az érvényességi kritériumok teljesülésének ellenőrzése céljából (24. pont). Ha a tisztulási fázis elején vett vízminta elemzése nem mutat ki vizsgálati anyagot, ez felhasználható annak indokolására, hogy miért nem mérik a vizsgálati anyagot a vizsgálati és a kontrollvízben a tisztulási fázis fennmaradó részében.

A felvételi fázis alatt legalább ötször, a tisztulási fázis alatt legalább négyszer kell halmintát venni a vizsgálati anyag tekintetében. Mivel egyes esetekben e mintaszámok alapján nehéz ésszerűen pontosan megbecsülni a BCF értékét, különösen, ha az egyszerű elsőrendűtől eltérő felvételi és tisztulási kinetika mutatkozik, tanácsos mindkét periódusban gyakrabban mintát venni (vö. 4. függelék).

A lipidtartalmat ugyanazon a biológiai anyagon kell meghatározni, mint amelyet a vizsgálati anyag koncentrációjának meghatározására használtak, legalább a felvételi fázis elején és végén, illetve a tisztulási fázis végén. Amennyiben ez nem megvalósítható, legalább három független halat kell mintavételezni a lipidtartalom meghatározására ugyanezen három időpont mindegyikében. A halak tartályonkénti számát a kísérlet kezdetekor ennek megfelelően kell kiigazítani ([1]). Vagylagosan, ha a kontrollhalakban (azaz a törzsállományból származó halakban) nem mutatható ki a vizsgálati anyag jelentős mennyisége, a vizsgálatban alkalmazott kontrollhalakat csak a lipidtartalom tekintetében kell vizsgálni, és a vizsgálati csoport(ok)ban a vizsgálati anyag elemzése (és a kapcsolódó felvételi sebességi állandó, tisztulási sebességi állandó és BCF-értékek) kiigazítható a kontrollcsoport lipidtartalmában a vizsgálat során bekövetkezett változásoknak megfelelően ([2]).

Elpusztult vagy beteg halat nem szabad a vizsgálati anyag vagy a lipidkoncentráció tekintetében elemezni.

Az elfogadható mintavételi ütemterv egy példája a 4. függelékben található. Más feltételezett K_{OW}-értékkel más ütemtervet is gyorsan ki lehet dolgozni a 95 %-os felvételhez szükséges expozíciós idő kiszámításához (a számítások tekintetében lásd az 5. függeléket).

A mintavételezést a felvételi fázisban addig kell folytatni, amíg létre nem jön az állandósult állapot (lásd az 1. függeléket a fogalommeghatározások és a mértékegységek tekintetében), vagy ameddig a felvételi fázis más okból le nem zárul (28 vagy 60 napot követően; vö. 37. és 38. pont). A tisztulási fázis kezdete előtt a halakat át kell helyezni tiszta edényekbe.

Mintavételezés és minta-előkészítés

Az analízishez a vízmintákat például inert csövön keresztül, a vizsgálati kamra középső pontjából veszik. A centrifugálás és a szűrés sem képes mindenkor arra, hogy szétválassza a vizsgálati anyag biológiailag nem hasznosítható részét a

([1]) Ha a lipidtartalmat nem ugyanabban a halban vizsgálják, mint a vizsgálati anyagot, a halaknak legalább hasonló tömegűnek és (ha releváns) azonos ivarúnak kell lenniük.

([2]) Ez az alternatíva csak arra az esetre érvényes, ha valamennyi vizsgálati csoportot hasonló méretű csoportokban tartanak, a halakat ugyanolyan mintázat szerint távolítják el és ugyanúgy etetik. Ez biztosítja, hogy a halak növekedése valamennyi vizsgálati csoportban hasonlóan alakuljon, ha a vizsgálati koncentráció elmarad a toxikus tartománytól. Hasonló növekedés esetén várhatóan a lipidtartalom is hasonló lesz. A kontroll eltérő növekedése az anyag hatását jelezheti és érvényteleníti a vizsgálatot.

▼M7

biológiailag hasznosíthatótól. Ha szétválasztási technikát alkalmaznak, a Vizsgálati jegyzőkönyvben mindig meg kell adni e technika indoklását vagy validálását, tekintettel a biológiai hasznosíthatósággal kapcsolatos nehézségekre (25). Főként a nagymértékben víztaszító anyagok esetében (azaz, amelyeknél a log K_{OW} érték > 5) (12) (26), ahol előfordulhat a szűrőre vagy a centrifugáló tartályokra való rárakódás, a mintákat nem szabad ilyen kezelésnek alávetni. Ehelyett a tartályokat minél tisztábban kell tartani (vö. 46. pont), és a teljes szervesszéntartalmat a felvételi és a tisztulási fázis alatt is figyelemmel kell kísérni (vö. 53. pont). Az alacsonyabb biológiai hasznosíthatósággal kapcsolatos lehetséges problémák elkerülése érdekében szilárd fázisú mikroextrakciós technikákkal történő mintavételt lehet alkalmazni a csekély mértékben oldható és rendkívül víztaszító anyagok esetében.

A mintába felvett halat azonnal le kell ölni, a legmegfelelőbb és leghumánusabb módszerrel (a teljes halra vonatkozó mérések esetén a vízzel való leöblítésen, vö. 28. pont, és a hal itatóspapírral történő szárításán túlmenően nincs szükség további eljárásra). A hal tömegét és teljes hosszát meg kell mérni ([1]). Az egyes halak esetében a mért tömeget és hosszt össze kell kapcsolni az elemzett anyag koncentrációjával (és adott esetben a lipidtartalommal), például az egyes mintavételezett halakra alkalmazott egyedi azonosító kóddal.

A lebomlás vagy egyéb veszteségek elkerülése érdekében a halakat és a vizet lehetőleg rögtön mintavételezés után kell analizálni, és a vizsgálat előrehaladtával ki kell számolni a felvételi és a tisztulási sebességi állandó közelítő értékeit. Az azonnali analízis lehetővé teszi annak kiküszöbölését is, hogy egy platót (állandósult állapotot) késve ismerjenek fel.

Az azonnali analízis meghiúsulása esetén a mintákat megfelelő módszerrel kell tárolni. A vizsgálat kezdete előtt információkat kell szerezni a különböző vizsgálati anyagok tárolásának megfelelő módszeréről – például mélyhűtés, 4 °C-on tartás, extrakció stb. A tárolás időtartamát úgy kell megválasztani, hogy biztosított legyen, hogy az anyag ne romoljon meg a tárolás során.

Az analitikai módszer minősége

Mivel az egész eljárást alapvetően a vizsgálati anyaghoz használt analitikai módszer pontossága és érzékenysége határozza meg, kísérlettel ellenőrizni kell az anyag analízisének pontosságát és reprodukálhatóságát, és azt, hogy a vizsgálati anyag vízből és halakból való visszanyerése az adott módszer tekintetében kielégítő-e. Ennek az elővizsgálat részét kell képeznie. Azt is ellenőrizni kell, hogy a vizsgálati anyag nem észlelhető-e a használt hígítóvízben. A vizsgálati anyag vízben és halakban meglévő koncentrációjának a vizsgálat során kapott értékeit – szükség szerint – korrigálni kell a visszanyeréssel és a kontrollok háttérértékeivel. A hal- és vízmintákkal végig úgy kell bánni, hogy minimális legyen a szennyezés és a (pl. a mintavevő eszköz adszorpciójából eredő) veszteség.

Halminták analízise

Amennyiben a vizsgálat során radioaktívan jelölt anyagokat használtak, mérhető az össz-radioaktivitás (a kiindulási anyagé és a metabolitokét együttesen), vagy a minták megtisztíthatók úgy, hogy a kiindulási anyag külön analizálható legyen. Ha a BCF-nek a kiindulási anyagon kell alapulnia, legalább a felvételi fázis végén jellemezni kell a főbb metabolitokat (vö. 6. pont). A főbb metabolitok azok, amelyek a halszövetben az összes maradékanyag ≥ 10 %-át képviselik, amelyek két egymást követő mintavételi ponton ≥ 5 %-át képviselik, amelyek a felvételi fázis egészében emelkedő szintet mutatnak, továbbá amelyekkel kapcsolatosan toxikológiai aggályok ismertek. Ha az egész halra vonatkozó

([1]) A tömeg mellett a teljes hosszt is rögzíteni kell, mivel a vizsgálat során bekövetkezett hossznövekedés mértékének összehasonlítása megfelelően jelzi, hogy bekövetkezett-e káros hatás.

▼M7

BCF az összes radioaktív jelöléssel ellátott maradékanyag esetében ≥ 500, tanácsos – és az anyagok egyes kategóriái, például a peszticidek esetében erőteljesen ajánlott – a főbb metabolitok azonosítása és számszerűsítése. E metabolitok számszerűsítését egyes szabályozó hatóságok is előírhatják. Ha a halszövetben az összes radioaktív jelöléssel ellátott maradékanyag ≥ 10 %-ában azonosítanak és számszerűsítenek bomlástermékeket, ajánlott a bomlástermékek vizsgálati vízben történő azonosítása és számszerűsítése is. Amennyiben ez nem megvalósítható, ezt ki kell fejteni a Vizsgálati jegyzőkönyvben.

A vizsgálati anyag koncentrációját rendszerint meg kell határozni minden lemért halban. Amennyiben ez nem lehetséges, az egyes mintavételi alkalmakkor összevonhatók a minták, de az összesítés korlátozza az adatokra alkalmazható statisztikai eljárások számát, ezért a kívánt összevonási eljáráshoz, statisztikai eljáráshoz és statisztikai erőhöz szükséges, megfelelő számú halat kell felvenni a vizsgálatba. A (27) és (28) referencia használható a megfelelő összevonási eljárások bevezetéseként.

A BCF-et (a nedves tömeg alapján) 5 %-os lipidtartalmú halra normalizálva kell kifejezni a vizsgálatból közvetlenül származtatotton kívül (vö. 21. pont), kivéve, ha igazolható, hogy a vizsgálati anyag elsődlegesen nem lipidekben halmozódik fel. A halak lipidtartalmát minden mintavételi alkalommal meg kell határozni amennyiben lehetséges, ezt lehetőség szerint a vizsgálati anyag analíziséhez készítettel azonos extraktumon kell elvégezni, mert a lipideket gyakran el kell távolítani az extraktumból, mielőtt kromatográfiásan elemezhetők lennének. Ugyanakkor a vizsgálati anyagok elemzéséhez gyakran speciális extrakciós eljárásokra van szükség, amelyek ellentmondásban lehetnek a lipid meghatározására szolgáló vizsgálati módszerekkel. Ebben az esetben (amíg nem áll rendelkezésre megfelelő, nem destruktív műszeres módszer), ajánlott különböző stratégiát alkalmazni a hal lipidtartalmának meghatározására (vö. 56. pont). A lipidtartalom meghatározására megfelelő módszereket kell alkalmazni (20). Szabványmódszerként a kloroform/metanol extrakciós technika (29) ajánlott (30), alternatív technikaként pedig a Smedes-féle módszer (31). Ez utóbbi módszert az extrakció összehasonlítható hatékonysága, nagy pontosság, kevesebb toxikus szerves oldószer alkalmazása jellemzi, emellett könnyen elvégezhető. Megfelelő indoklással alkalmazhatók más olyan módszerek, amelyek tekintetében a pontosság lehetőség szerint az ajánlott módszerekhez hasonló. Az alkalmazott módszert fontos részletesen ismertetni.

A halak növekedésének mérése

A vizsgálat kezdetén a törzsállományból öt–tíz hal tömegét és teljes hosszát kell egyenként lemérni. Ezek megegyezhetnek a lipidanalízishez használt halakkal (vö. 56. pont). Az egyes mintavételekhez használt, mind a vizsgálati, mind a kontrollcsoportból származó halak tömegét és hosszát a kémiai és lipidanalízis előtt meg kell mérni. E mintába felvett halakra vonatkozó mérések használhatók a vizsgálati és kontrolltartályokban maradó halak tömegének és hosszának becsléséhez (vö. 45. pont).

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Eredmények feldolgozása

A vizsgálati anyag felvételi görbéje úgy jön létre, hogy a felvételi fázisban a halakban/halakon (vagy meghatározott szövetekben/szöveteken) mért koncentrációt az idő függvényében, aritmetikus skálán ábrázolják. Amennyiben a görbe platót ér el, vagyis megközelítőleg párhuzamos az időtengellyel, az állandósult állapoti BCF (BCF_{SS}) a következő képlet alapján számolható:

$$\frac{C_f \text{állandósult állapot}(\text{átlag})}{C_w \text{állandósult állapot}(\text{átlag})}$$

▼M7

A C_f alakulását befolyásolhatja a halak növekedése (vö. 72. és 73. pont). Az expozíciós koncentráció átlagát (C_w) az időbeli eltérés befolyásolja. Várható, hogy az idővel súlyozott átlagos koncentráció relevánsabb és pontosabb a bioakkumulációs vizsgálatok szempontjából, még akkor is, ha az eltérés a megfelelő validálási tartományon belül van (vö. 24. pont). A vízben mért idővel súlyozott átlagos koncentráció (TWA) az 5. függelék 1. szakasza alapján számítható ki.

A kinetikus biokoncentrációs tényezőt (BCF_K) a két elsőrendű kinetikai sebességállandó k_1/k_2 hányadosaként kell meghatározni. A k_1, k_2 sebességállandókat és a BCF_K-t a felvételi és a tisztulási fázis egyidejű illesztéséből lehet kinyerni. Vagylagosan a k_1-et és a k_2-t lépcsőzetesen is meg lehet határozni (lásd az 5. függeléket e két módszer leírása és összehasonlítása tekintetében). A tisztulási sebességi állandót (k_2) esetleg korrigálni kell a növekedés okozta hígulásra tekintettel (vö. 72. és 73. pont). Amennyiben a felvételi és/vagy tisztulási görbe nyilvánvalóan nem elsőrendű, összetettebb modelleket kell alkalmazni (lásd az 5. függelék hivatkozásait), és biostatisztikus és/vagy farmakokinetikus szakvéleményét kell kikérni.

A halak tömegére/hosszára vonatkozó adatok

Az egyes halak nedves tömegét és teljes hosszát minden mintavételezési intervallum vonatkozásában elkülönített táblázatban kell vezetni a vizsgálati és a kontrollcsoport tekintetében a felvételi (ideértve a felvételi fázis kezdetén meglévő törzsállományt) és a tisztulási fázis során. Az egyes halak esetében a mért tömeget és hosszt össze kell kapcsolni az elemzett vegyi anyag koncentrációjával, például a mintába felvett egyes halakra alkalmazott egyedi azonosító kóddal. A kinetikus BCF-értékek növekedés okozta hígulásra tekintettel történő korrigálásának céljára a növekedés előnyben részesített mértéke a tömeg (lásd a 73. pontot és az 5. függeléket a növekedés okozta hígulás tekintetében alkalmazott korrekció módszere vonatkozásában).

A növekedés okozta hígulásra tekintettel alkalmazott korrekció és a lipidtartalomra tekintettel történő normalizáció

A halak tisztulási fázisban bekövetkezett növekedése csökkentheti a halakban mért vegyianyag-koncentrációt, ezáltal a teljes tisztulási sebességi állandó (k_2) magasabb lesz, mint a kiválasztási folyamatokból (pl. légzés, anyagcsere, kiürítés) eredne. A kinetikus biokoncentrációs tényezőket korrigálni kell a növekedés okozta hígulásra tekintettel. A növekedés a BCF_{SS}-t is befolyásolja, de nem áll rendelkezésre elfogadott eljárás a BCF_{SS} növekedésre tekintettel történő korrigálására. Jelentős növekedés esetén a növekedésre tekintettel korrigált BCF_K-t (BCF_{Kg}) is számítani kell, mivel lényegesebb mérték lehet, mint a biokoncentrációs tényező. A vizsgálati halak lipidtartalma (amely nagymértékben összefügg a víztaszító anyagok biológiai felhalmozódásával) kellő mértékben változhat a gyakorlatban, így szükség lehet egy rögzített lipidtartalomra (5 % w/w) tekintettel történő normalizációra, amely hasznosan jeleníti meg mind a kinetikus, mind az állandósult állapoti biokoncentrációs tényezőket, kivéve, ha igazolható, hogy a vizsgálati anyag elsődlegesen nem lipidekben halmozódik fel (pl. egyes perfluorozott anyagok fehérjékhez kapcsolódhatnak). Az e számításokkal kapcsolatos egyenletek és példák az 5. függelékben találhatók.

A kinetikus BCF növekedés okozta hígulásra tekintettel történő korrigálásához a tisztulási sebességi állandót ki kell igazítani a növekedés figyelembevételével. A növekedéssel korrigált tisztulási sebességi állandó (k_{2g}) a növekedési sebességi állandó (a mért tömeggel kapcsolatos adatokból számolt k_g) teljes tisztulási sebességi állandóból (k_2) való kivonásával számítható ki. A növekedéssel korrigált kinetikus biokoncentrációs tényezőt ezt követően úgy lehet kiszámítani, hogy el kell osztani a felvételi sebességi állandót (k_1) a növekedéssel korrigált tisztulási sebességi állandóval (k_{2g}) (vö. 5. függelék). Egyes esetekben ez a megközelítés hibás lehet. Például nagyon lassan tisztuló, gyorsan növekedő halakban vizsgált anyagok esetében a származtatott k_{2g} nagyon csekély lehet, így az ennek származtatásához használt két sebességi állandóban kritikus lesz a hiba, és bizonyos

▼M7

esetekben a k_g becslései meghaladhatják a k_2-t. A növekedés okozta hígulásra tekintettel végzett korrekciót szükségtelenné tevő alternatív megközelítés a vizsgálati anyag halankénti (egész halra vetített) tömegét tükröző tisztulási adatokat alkalmazza, szemben a szokásos, a vizsgálati anyagnak a hal egységnyi tömegéhez viszonyított tömegére (koncentrációra) vonatkozó adatokkal. Ez könnyen elérhető adat, mivel az e vizsgálati módszer szerinti vizsgálatoknak a feljegyzett szöveti koncentrációkat az egyes halak tömegéhez kell kapcsolniuk. Az erre szolgáló egyszerű eljárást az 5. függelék ismerteti. Meg kell jegyezni, hogy a k_2-t akkor is fel kell tüntetni a Vizsgálati jegyzőkönyvben, ha ezt az alternatív megközelítést alkalmazzák.

A kinetikus és az állandósult állapoti biokoncentrációs tényezőket a halak alapértelmezett 5 %-os (w/w) lipidtartalmához viszonyítva is fel kell tüntetni a Vizsgálati jegyzőkönyvben, hacsak nem igazolható, hogy a vizsgálati anyag elsődlegesen nem lipidekben halmozódik fel. A halakkal kapcsolatos koncentrációs adatokat vagy a BCF-et az 5 % és a (nedves tömeg százalékában kifejezett) tényleges (egyedi) átlagos lipidtartalom hányadosa szerint kell normalizálni (vö. 5. függelék).

Ha a kémiai és a lipidanalízist ugyanazon a halon végezték el, akkor az adott halra vonatkozó, egyedi, a lipidtartalom tekintetében normalizált adatokat kell felhasználni a lipidtartalom szempontjából normalizált BCF kiszámításához. Vagylagosan, ha a kontrollcsoportba és a kitett csoportba tartozó halak növekedése hasonlóan alakul, a kontrollhalak lipidtartalma önmagában felhasználható a lipidtartalomra tekintettel történő korrekcióhoz (vö. 56. pont). A lipidtartalom szempontjából normalizált BCF kiszámításának egyik módszere az 5. függelékben található.

Az eredmények kiértékelése

Amennyiben a vizsgálati oldatok mért koncentrációi az analitikai módszer érzékelési határához közeli szinten vannak, az eredményeket óvatosan kell kiértékelni.

A vizsgálati és a kontrollcsoportban megfigyelt átlagos növekedés elvben nem lehet nagymértékben különböző, hogy a toxikus hatások kizárhatók legyenek. A két csoport növekedési sebességi állandóit vagy növekedési görbéit megfelelő eljárással össze kell hasonlítani ([1]).

Az egyértelműen definiált felvételi és tisztulási görbe megbízható biokoncentrációs adatokat jelez. A sebességi állandók tekintetében a χ^2 görbeillesztési vizsgálat eredményeinek megfelelő illeszkedést kell mutatniuk (azaz kis mérési hibaszázalékot (32)) a bioakkumulációs modell esetében, hogy a sebességi állandókat megbízhatónak lehessen tekintetni (vö. 5. függelék). Ha egynél több vizsgálati koncentrációt alkalmaznak, a felvételi/tisztulási állandók vizsgálati koncentrációk közötti eltérésének 20 % alatt kell lennie ([2]). Amennyiben ez nem áll fenn, az koncentrációtól való függésre utalhat. Az alkalmazott vizsgálati koncentrációk felvételi/tisztulási sebességi állandóinak megfigyelt jelentős különbségét rögzíteni kell, és meg kell adni rá a lehetséges magyarázatokat. A jól megtervezett vizsgálatokból kapott BCF-ek 95 %-os konfidenciahatára általában megközelíti a származtatott BCF ± 20 %-át.

Ha két vagy több koncentrációt vizsgálnak, az eredményeket mindkét vagy valamennyi koncentráció esetében felhasználják annak vizsgálatára, hogy az eredmények

([1]) A növekedési sebességi állandókon t-próba végezhető annak vizsgálata érdekében, hogy a növekedés eltérő-e a kontroll- és a vizsgálati csoportok között, vagy F-próba végezhető a szóródás elemzése esetén. Szükség esetén F-próba vagy valószínűségi arány használható a megfelelő növekedési modell megválasztásához (54. OECD-monográfia, (32)).

([2]) E százalékos arányok feltételezik, hogy az analitikai módszer megbízható és a felezési idő kevesebb, mint 14 nap. Ha az analitikai módszer kevésbé megbízható, vagy ha a felezési idő (jóval) magasabb, e számok nagyobbak lesznek.

▼M7

következetesek-e, továbbá annak kimutatására, hogy van-e koncentrációfüggés. Ha csak egy koncentrációt vizsgálnak az állatok és/vagy erőforrások használatának mérséklése érdekében, indokolni kell az egy koncentráció alkalmazását.

Az eredményként adódó BCF_{SS} kétséges, ha a BCF_K lényegesen nagyobb, mint a BCF_{SS}, mivel ez arra utalhat, hogy nem jött létre állandósult állapot, vagy hogy nem vették figyelembe a növekedés okozta hígulást és a mennyiség csökkenésével járó folyamatokat. Ha a BCF_{SS} jóval meghaladja a BCF_K-t, a felvételi és tisztulási sebességi állandók származtatását ellenőrizni kell a hibák tekintetében és újra kell értékelni. Más illesztési eljárás javíthatja a BCF_K becslését (vö. 5. függelék).

Vizsgálati jegyzőkönyv

A vizsgálati anyagra vonatkozó, a 3. pontban feltüntetett információn felül a Vizsgálati jegyzőkönyv a következő információt tartalmazza:

Vizsgálati anyag:

fizikai jelleg és adott esetben a fizikai és kémiai tulajdonságok,

— kémiai azonosító adatok, például IUPAC- vagy CAS-név, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. (ideértve adott esetben a szervesszén-tartalmat).

— A több összetevőből álló anyagok és UVCB-k (ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakciótermékek vagy biológiai anyagok) esetében lehetőség szerint az egyedi alkotóelemek kémiai azonosítójának leírása, és minden alkotóelemnek az anyag össztömegében képviselt százaléka. Össze kell foglalni, hogy a vizsgálat során alkalmazott analitikai módszer miként jeleníti meg az anyag koncentrációjának mérését; valamennyi analitikai eljárást be kell mutatni, ideértve a módszer pontosságát, érzékelési határát és meghatározási határát;

— Amennyiben radioaktívan jelölt(ek), a jelölt atom(ok) pontos helyzete, és a szennyeződésekhez kapcsolódó radioaktivitás százaléka.

— A vizsgálati anyag halakkal (ideális esetben a vizsgálati fajokkal) szembeni toxicitásával kapcsolatos információ. A toxicitást akut 96 órás LC_{50}-ként kell a Vizsgálati jegyzőkönyvben feltüntetni, és meg kell adni a krónikus vizsgálatból (azaz korai életszakaszra vonatkozó vizsgálat vagy teljes életciklusra vonatkozó vizsgálat, ha rendelkezésre áll) származó NOAEC és LOAEC értékeket.

— A vizsgálati vegyi anyag vagy vizsgálati anyag tárolási körülményei, illetve a vizsgálati vegyi anyag vagy vizsgálati anyag tárolás alatti stabilitása, ha a használat előtt tárolják.

Vizsgálati fajok:

tudományos név, törzs, származás, bármilyen előkezelés, akklimatizálás, kor, ivar (ha releváns), mérettartomány (tömeg és hossz) stb.

Vizsgálati körülmények

— Az alkalmazott vizsgálati eljárás (pl. félstatikus vagy átfolyásos); rendszeres vizsgálat vagy minimalizált terv (magyarázattal és indokolással együtt).

— Az alkalmazott megvilágítás típusa és jellemzői, valamint a megvilágítási időszak(ok).

— Vizsgálati terv (pl. a vizsgálati kamrák száma és mérete, víztérfogat-csere sebessége, betelepítési arány, ismétlések száma, halak száma ismétlésenként, kísérleti koncentrációk száma, a felvételi és a tisztulási fázis hossza, hal- és vízminták mintavételi gyakorisága).

▼M7

— Törzsoldatok előállításának módszere és a megújítás gyakorisága (amennyiben használtak ilyet, meg kell adni az oldószert, koncentrációját, és hogy a vizsgálati víz szervesszén-tartalmához mennyiben járult hozzá), vagy az alternatív adagolási rendszer leírása.

— A névleges vizsgálati koncentrációk, a vizsgálati edényben mért értékek átlaga és ezek szórása, továbbá a kiszámítás módszere és gyakorisága.

— A hígítóvíz forrása, az előkezelések leírása, a vizsgálati hal azon tulajdonságát igazoló eredmények, hogy képes a vízben élni, továbbá a víz tulajdonságai: pH-érték, keménység, hőmérséklet, oldottoxigén-koncentráció, maradékklór-tartalom (amennyiben mérik), teljes szervesszén-tartalom, szuszpendált szilárd anyagok, a vizsgálati közeg sótartalma (amennyiben mérik) és bármely más mérési adat.

— Vízminőség a vizsgálati edényekben, pH, keménység, TOC, hőmérséklet és oldottoxigén-koncentráció; az alkalmazott módszerek és a mérési gyakoriság.

— Az etetésre vonatkozó részletes információk (például a táp(ok) fajtája, eredete, összetétele – legalább a lipid- és fehérjetartalom, amennyiben lehetséges) a kiválasztott etetési arány, a beadott táp mennyisége és az etetési gyakoriság;

— Információk a hal- és vízminták kezeléséről, beleértve az előállítás részleteit, a tárolást, az extrakciót és az analitikai eljárásokat (és pontosságot) a vizsgálati anyag és a lipidtartalom vonatkozásában.

— A kezelések randomizálására és a halak vizsgálati edényekbe osztására alkalmazott módszerek.

— A vizsgálati szervezetek vizsgálati oldatokba helyezésének napja és a vizsgálat időtartama.

— A dózisbehatároló vizsgálat és az eredményeinek bemutatása, ha van ilyen.

Eredmények:

— Minden elvégzett előzetes vizsgálat eredménye.

— A kontrollhalak és az egyes expozíciós kamrákban lévő halak mortalitása, és bármely megfigyelt rendellenes viselkedés.

— Minden megfigyelt káros hatás leírása.

— A kémiai analízis valamennyi alkalmazott eljárásának leírása, ideértve az érzékelési határt és a meghatározási határt, a változékonyságot és a visszanyerést.

— A hal lipidtartalma, ideértve az alkalmazott módszert, és ha számítják ezt az adatot, a lipidnormalizációs tényezőt (L_n, az 5 %-os lipidtartalomhoz viszonyított eredményeket kifejező tényező).

— A hal tömegével (és hosszával) kapcsolatos adatok táblázatos formában, amelyeket összekapcsolnak a vegyi anyagok egyedi halakban mért koncentrációival (és adott esetben a lipidtartalmukkal), mind a kontroll-, mind a kitett csoportban (például a mintába felvett egyes halakra egyedi azonosító alkalmazásával) és a származtatott növekedési sebességi állandó(k) számítása.

▼M7

— A vizsgálati anyag koncentrációja halakban (C_f az egyes halakhoz kapcsolva) és vízben (C_w), táblázatos formában (átlagok a vizsgálati és a kontrollcsoportra, szórás és tartomány adott esetben), minden mintavételi idő tekintetében (C_f mg/kg-ban kifejezve a teljes test vagy konkrét szövetei nedves tömegéhez viszonyítva, pl. lipid, és C_w mg/l-ben). A kontrollsorozat C_w értékei (a háttérértékeket is fel kell tüntetni a Vizsgálati jegyzőkönyvben).

— Görbék (ideértve valamennyi mért adatot), amelyek a következőket mutatják be (adott esetben a koncentrációt az egész testhez és az 5 %-ban normalizált állati vagy szöveti lipidtartalomhoz viszonyítva is ki lehet fejezni):

  — növekedés, azaz a hal tömege az idő függvényében, vagy a természetes alapú logaritmussá transzformált tömeg az idő függvényében (ideértve a származtatott növekedési sebességi állandót, k_g);

  — a vizsgálati anyag halban megfigyelt felvétele és tisztulása (egyetlen grafikonon);

  — az állandósult állapot eléréséhez szükséges idő (ha létrejött az állandósult állapot);

  — természetes alapú logaritmussá transzformált koncentráció a felvételi idő függvényében (ideértve a származtatott k_1 felvételi sebességi állandót);

  — természetes alapú logaritmussá transzformált koncentráció (ln koncentráció) a tisztulási idő függvényében (ideértve a származtatott k_2 tisztulási sebességi állandót);

  — mind a felvételi, mind a tisztulási fázis görbéi, amelyek mind az adatokat, mind az illesztési modellt bemutatják.

— Ha az ábra szemmel láthatóan egyértelmű kiugró értékeket mutat, statisztikailag érvényes kiugróérték-tesztet lehet alkalmazni a hamis adatpontok törlésére, valamint ezek mellőzését indokolni kell.

— Az állandósult állapoti biokoncentrációs tényező (BCF_{SS}), ha az állandósult állapot (majdnem) létrejött.

— A kinetikus biokoncentrációs tényező (BCF_K) és a származtatott felvételi és tisztulási sebességi állandók (k_1 és k_2) a k_2 szóródásaival együtt (meredekség és metszés) lépcsőzetes illesztés alkalmazása esetén.

— Konfidenciahatárok, szórás (ha rendelkezésre áll) és az alkalmazott vizsgálati anyag minden egyes koncentrációjának minden egyes paraméterére vonatkozó számítás/adatelemzés módszerei

  — A radioaktív jelöléssel ellátott vizsgálati anyagok metabolitjaira és felhalmozódásukra vonatkozó információ.

  — Növekedési sebességi állandó(k) (ideértve a 95 %-os konfidencia-intervallumo(ka)t), illetve a számított, növekedéssel korrigált tisztulási sebességi állandók (k_{2g}), felezési idő, BCF (BCF_{Kg}) értékek.

  — Bármi szokatlan dolog a vizsgálattal kapcsolatban, bármilyen eltérés ezektől az eljárásoktól, és bármely más vonatkozó információ.

  — A releváns mért és számított adatok összefoglaló táblázata az alábbiakban látható:

▼M7

Az anyag felvételi és tisztulási sebességi állandói és biokoncentrációs tényezők (BCF)	
k_g (növekedési sebességi állandó; nap^{-1}):	Írja be az értéket (95 % KI) (1)
k_1 (teljes felvételi sebességi állandó; 1 kg^{-1} nap^{-1}):	Írja be az értéket (95 % KI) (1)
k_2 (teljes tisztulási sebességi állandó; nap^{-1}):	Írja be az értéket (95 % KI) (1)
k_{2g} (növekedéssel korrigált tisztulási sebességi állandó; nap^{-1}):	Írja be az értéket (95 % KI) (1)
C_f (a vegyi anyag koncentrációja a halban állandósult állapotnál; mg kg^{-1}):	Írja be az értéket ± SD (2)
C_w (a vegyi anyag koncentrációja a vízben; mg l^{-1}):	Írja be az értéket ± SD (2)
L_n (lipidnormalizációs tényező):	Írja be az értéket (3)
BCF_{SS} (állandósult állapoti BCF; 1 kg^{-1})	Írja be az értéket ± SD (2)
BCF_{SSL} (lipidtartalom tekintetében normalizált, állandósult állapoti BCF; 1 kg^{-1})	Írja be az értéket (3) ± SD (2)
BCF_K (kinetikus BCF; 1 kg^{-1})	Írja be az értéket (95 % KI) (1)
BCF_{Kg} (növekedéssel korrigált kinetikus BCF; 1 kg^{-1})	Írja be az értéket (95 % KI) (1)
$t_{1/2g}$ (növekedéssel korrigált felezési idő, nap):	Írja be az értéket (95 % KI) (1)
BCF_{KL} (lipidtartalom tekintetében normalizált kinetikus BCF; 1 kg^{-1})	Írja be az értéket
BCF_{KLG} (lipidtartalom tekintetében normalizált, növekedéssel korrigált kinetikus BCF; 1 kg^{-1})	Írja be az értéket

(1) KI: konfidencia-intervallum (ha meg lehet becsülni)
(2) SD: szórás (ha meg lehet becsülni)

Az előzetes vizsgálati módszer fejlesztésével és kísérlettervezéssel „érzékelési határon/meghatározási belül nem kimutatott/meghatározott” eredményeket kerülni kell, mert az ilyen eredmények nem használhatók sebességi állandók számolásához.

C.13. – II: **VÍZI EXPOZÍCIÓN ALAPULÓ MINIMALIZÁLT HALVIZSGÁLAT**

BEVEZETÉS

A mind a laboratóriumok, mind a szabályozó hatóságok által a teljes vizsgálatok lefolytatása és kiértékelése során szerzett egyre több tapasztalat azt mutatja, hogy néhány kivétellel elsőrendű kinetika érvényes a felvételi és tisztulási sebességi állandók becslésére. Így a felvételi és tisztulási sebességi állandók becsülhetők minimális mintavételi ponttal, és származtatható a kinetikus BCF.

A BCF-vizsgálatok alternatív tervei megvizsgálásának eredeti célja az volt, hogy kialakítsanak egy kisebb vizsgálatot, amelyet köztes vizsgálati lépésként fel lehet használni a K_{OW}-n és QSAR-okon alapuló BCF-becslések megcáfolására vagy

▼M7

megerősítésére, és így nem lesz szükség teljes vizsgálat lefolytatására számtalan anyag tekintetében, minimalizálhatók a költségek és az állatok felhasználása a mintavételezés és a végrehajtott elemzési szekvenciák számának csökkentése útján. A korábbi vizsgálati módszerek elsődleges tervét követve annak érdekében, hogy lehetővé váljon a vizsgálati eredmények meglévő BCF-adatokkal való integrációja, és hogy könnyebb legyen a vizsgálat végrehajtása és az adatok kiértékelése, a cél az volt, hogy kellő pontosságú BCF-becsléseket biztosítsanak a kockázatértékelési döntésekhez. A teljes vizsgálatra alkalmazandó megfontolások közül számos ebben az esetben is érvényes (vö. 24. pont), pl. az érvényességi kritériumok, valamint a vizsgálat leállítása, ha jelentéktelen felvétel látható a felvételi fázis végén (vö. 16. és 38. pont).

A minimalizált vizsgálati tervbe felvehető anyagoknak ahhoz az általános területhez kell tartozniuk, amelynek tekintetében e vizsgálati módszert kialakították, ezek a nem poláris szerves anyagok (vö. 49. pont). Ha bármi arra utal, hogy a vizsgálandó anyag esetlegesen eltérő viselkedést mutat (pl. egyértelműen eltér az elsőrendű kinetikától), teljes vizsgálatot kell végezni szabályozói céllal.

A minimalizált vizsgálat általában nem tart rövidebb ideig, mint a standard BCF-vizsgálat, hanem kevesebb halminta-vételt foglal magában (a magyarázat tekintetében lásd a 6. függeléket). Ugyanakkor a tisztulási időszak csökkenthető a gyorsan tisztuló anyagok esetében, hogy ne legyenek a érzékelési/meghatározási határtól elmaradó, halban megfigyelt koncentrációk a vizsgálat vége előtt. Az egyetlen koncentrációt és minimális expozíciót alkalmazó halvizsgálat felhasználható a teljes vizsgálat szükségességének meghatározására; és ha a sebességi állandók és a BCF kiszámításához használt, eredményül adódó adatok megbízhatóak (vö. 93. pont), a teljes vizsgálattól el lehet tekinteni, ha az eredményként adódó BCF nem éri el az aggodalomra okot adó szabályozói értékeket.

Egyes esetekben előnyösebb lehet egynél több koncentrációt alkalmazó minimalizált vizsgálati terv mint előzetes vizsgálat lefolytatása annak meghatározására, hogy egy adott anyagra vonatkozó BCF-becslések koncentrációfüggőek-e. Ha a minimalizált vizsgálatból származó BCF-becslések koncentrációfüggést mutatnak, szükség lesz a teljes vizsgálat lefolytatására. Ha e minimalizált vizsgálat alapján a BCF-becslések nem koncentrációfüggőek, de az eredmények nem tekinthetők döntőnek, minden további teljes vizsgálat lefolytatható egyetlen koncentrációval, ezáltal csökkentve az állatok felhasználását a két (vagy több) koncentrációt alkalmazó teljes vizsgálathoz képest.

A minimalizált vizsgálatra alkalmas anyagok esetében a következő feltételeknek kell teljesülniük:

— Valószínűleg megközelítőleg elsőrendű felvételi és tisztulási kinetikát tanúsítanak, pl. hasonló anyagokra való kereszthivatkozással származtatva;

— A log K_{OW} értékük < 6, kivéve, ha gyors anyagcsere várható ([1]);

— Kellően vízoldékonyak az analitikai technikára tekintettel (vö. 24. pont);

— Egyértelműen számszerűsíthetők (azaz a koncentrációknak legalább egy nagyságrenddel a meghatározási határ felett kell lenniük), mind a halban, mind a vízben, radioaktív jelölés ajánlott (vö. 23. pont); és

— Tisztulási időszakuk hosszabb, mint a várható felezési idő (vö. 5. függelék a számítások tekintetében) vagy a tisztulási időszakot ennek megfelelően kell kiigazítani (vö. 91. pont). E szabály alól kivétel engedett, ha várható az anyag gyors anyagcseréje.

([1]) A minimalizált vizsgálat ténylegesen felhasználható gyors anyagcsere kimutatására, ha a gyors anyagcsere valószínűsége köztudott.

▼M7

A MINIMALIZÁLT TERVET KÖVETŐ VIZSGÁLATOK MINTAVÉTELI TERVE

Halak mintavételezése

A halak mintavételezése négy mintavételi pontra korlátozódik:

— A felvételi fázis közepén és végén (ez utóbbi a tisztulási fázis kezdete is), pl. 14 és 28 nap után (33).

— A tisztulási fázis közepén és a vizsgálat végén (amikor az anyag koncentrációja < a maximális koncentráció 10 %-ánál, vagy legalább egyértelműen túl van az anyag egy felezési idején) pl. a tisztulás 7. és 14. napját követően (33). Ha gyors tisztulás várható vagy tapasztalt, szükség lehet a tisztulási időszak lerövidítésére, hogy elkerülhetők legyenek a meghatározási határ alatti, halban mért koncentrációk.

— Lipidmérés, mint a teljes vizsgálatnál.

— Növekedésre tekintettel történő korrekció, mint a teljes vizsgálatnál.

— A BCF-et kinetikus BCF-ként számítják ki.

Víz mintavételezése

A minimalizált terv szerint a vizet a teljes vizsgálathoz hasonlóan mintavételezik (vö. 54. pont) vagy legalább a felvételi fázis során ötször, egyenlően elosztott időközönként, a tisztulási fázisban pedig hetente.

A tervezés módosításai

Tekintettel a vizsgálati anyag tulajdonságaira, az érvényes QSAR előrejelzésekre és a vizsgálat konkrét céljára, mérlegelni lehet a vizsgálati terv módosításait:

— Ha nagyobb pontosságra van szükség, több hal (a 4 helyett 6 vagy 8) használható a felvételi fázis végén vett mintához.

— Egy „további” halcsoport felvétele, ha a 14 napos tisztulás (vagy a tisztulási fázis előrejelzett vége) nem volt elég a megfelelő tisztuláshoz (azaz > 50 %). Ha a tisztulási fázis előrejelzett időtartama 14 napnál hosszabb vagy rövidebb, a mintavételi ütemtervet ki kell igazítani (azaz egy halcsoport a tisztulási fázis előrejelzett végén, és egy csoport ezen idő felénél).

— Két vizsgálati koncentráció alkalmazása a lehetséges koncentrációfüggés feltárása érdekében. Ha a két vizsgálati koncentrációval lefolytatott minimalizált vizsgálat eredményei azt mutatják, hogy a BCF nem koncentrációfüggő (azaz 20 %-nál csekélyebb az eltérés), egy koncentráció elegendőnek tekinthető a teljes vizsgálathoz, ha azt elvégzik.

— Valószínűsíthető, hogy a bioakkumulációs folyamatok modelljei, mint amelyeket Arnot és munkatársai javasolnak (35), felhasználhatók a felvételi és tisztulási fázisok időtartamának tervezéséhez (lásd még az 5. függeléket).

Számítások

E megközelítés mögött az a logika húzódik, hogy a teljes vizsgálatban a biokoncentrációs tényező vagy állandósult állapoti biokoncentrációs tényezőként (BCF_{SS}) határozható meg a vizsgálati anyag halszövetben mért koncentrációja és a vizsgálati anyag vízben mért koncentrációja hányadosának kiszámításával, vagy kinetikus biokoncentrációs tényezőként a (BCF_K) felvételi sebességi állandó k_1 és a tisztulási sebességi állandó k_2 hányadosának kiszámításával. A BCF_K akkor is érvényes, ha az anyag állandósult állapoti koncentrációját nem érik el a felvételi fázisban, feltéve, hogy a felvétel és a tisztulás megközelítőleg elsőrendű kinetikai folyamatokat követ. Abszolút minimumként két adatpontra van

▼M7

szükség a felvételi és tisztulási sebességi állandók becsléséhez, egyre a felvételi fázis végén (azaz a tisztulási fázis kezdetén) egyre pedig a tisztulási fázis végén (vagy annak jelentős része elteltét követően). Közbenső mintavételi pont ajánlott a felvételi és tisztulási kinetika ellenőrzésére ([1]). A számítások tekintetében lásd az 5. és 6. függeléket.

Az eredmények kiértékelése

A vizsgálat érvényességének és informatív értékének áttekintéséhez meg kell győződni arról, hogy a tisztulási fázis meghalad-e egy felezési időt. A BCF_{Km}-et (a minimalizált vizsgálatból számított kinetikus BCF-et) össze kell hasonlítani a minimalizált BCF_{SS} értékkel (amely a felvételi fázis végén azon feltételezés mellett számított BCF_{SS}, hogy az állandósult állapot létrejött. Ez puszta feltételezés, mivel a mintavételi pontok száma nem elegendő ennek bizonyításához). Ha BCF_{Km} < minimalizált BCF_{SS}, a minimalizált BCF_{SS} érték az előnyben részesített érték. Ha a BCF_{Km} a minimalizált BCF_{SS} kevesebb, mint 70 %-a, az eredmények nem érvényesek, és teljes vizsgálatot kell lefolytatni.

Ha a minimalizált vizsgálat olyan BCF_{Km} eredményt ad, amely a szabályozói aggályokat felvető értéktartományba esik, teljes vizsgálatot kell folytatni. Ha az eredmény messze elmarad a szabályozói aggályokat felvető értékektől (jóval felette vagy alatta van), nincs feltétlenül szükség teljes vizsgálatra, vagy egyetlen koncentráción alapuló teljes vizsgálat is lefolytatható, ha a vonatkozó szabályozói keret ezt előírja.

Ha az egy koncentráció alkalmazásával lefolytatott minimalizált vizsgálatot követően megállapítást nyer, hogy teljes vizsgálatra van szükség, ezt el lehet végezni egy második koncentráción. Ha az eredmények összhangban vannak, el lehet tekinteni egy eltérő koncentrációval lefolytatott további teljes vizsgálattól, mivel várhatóan az anyag biokoncentrációja nem koncentrációfüggő. Ha a minimalizált vizsgálatot két koncentráció mellett folytatták le, és az eredmények nem utalnak koncentrációfüggésre, a teljes vizsgálat lefolytatható csak egy koncentrációval is (vö. 87. pont).

Vizsgálati jegyzőkönyv

A minimalizált vizsgálatra vonatkozó jelentésnek a teljes vizsgálatra előírt valamennyi információt tartalmaznia kell (vö. 81. pont), kivéve azokat, amelyeket nem lehet előállítani (azaz az állandósult állapotig eltelt időt bemutató görbét vagy az állandósult állapoti biokoncentrációs tényezőt, ez utóbbi helyett a minimalizált vizsgálatban számított BCF_{SS}-t kell megadni). Emellett a Vizsgálati jegyzőkönyvben ki kell térni a minimalizált vizsgálat alkalmazásának indokolására és az eredményként adódó BCF_{Km}-re.

C.13. – III.: **ÉTRENDI EXPOZÍCIÓN ALAPULÓ BIOAKKUMULÁCIÓS HALVIZSGÁLAT**

BEVEZETÉS

Az e szakaszban bemutatott módszert olyan anyagok tekintetében kell használni, amelyek esetében a vízi expozíciós módszer nem megvalósítható (például mivel az állandó, mérhető vízi koncentrációk nem tarthatók fenn, vagy a test megfelelő anyagterhelése nem érhető el az expozíció 60 napja alatt; a vízi expozíció tekintetében lásd az előző szakaszokat). Meg kell jegyezni ugyanakkor, hogy e vizsgálat végpontja inkább étrendi biomagnifikációs tényező (BMF) és nem biokoncentrációs tényező (BCF) ([2]).

2001 májusában a vízben csekély mértékben oldódó szerves anyagok biológiai felhalmozódásának vizsgálatára új módszert mutattak be a SETAC Europe (Környezettoxikológiai és Kémiai Társaság) madridi konferenciáján (36). Ez a munka a szakirodalomban ismertetett, különböző közölt bioakkumulációs vizsgálatokon

([1]) Ha csak két adatpontot mérnek, a BCF_{Km} konfidenciahatárainak becslését bootstrap módszerekkel is el lehet végezni. Ha közbenső adatpontok is rendelkezésre állnak, a BCF_{Km} konfidenciahatárait a teljes vizsgálathoz hasonlóan lehet kiszámítani.

([2]) A fogalommeghatározások és mértékegységek tekintetében lásd az 1. függeléket.

▼M7

alapult, amelyekben a vizsgálati anyaggal kiegészített tápot tartalmazó adagolási módszert alkalmaztak (pl. (37)). 2004 elején olyan protokolltervezetet (38) nyújtottak be az EU PBT munkacsoportjához, amelynek célja a vízben csekély mértékben oldódó szerves anyagok bioakkumulációs potenciáljának mérése, amely anyagok esetében a standard, vízi expozíción alapuló biokoncentrációs módszer nem megvalósítható; e tervezetet háttérdokumentum kísérte (39). A módszer tekintetében megadott további indok az volt, hogy a vízben csekély mértékben oldódó (azaz, ahol log K_{OW} >5) ezen anyagoknak való potenciális környezeti expozíció jórészt az étrend útján alakulhat ki (vö. (40) (41) (42) (43) (44)). Ebből az okból az étrendi expozíciós vizsgálatokra egyes, vegyi anyagokra vonatkozó közzétett rendeletek is hivatkoznak ([1]). Fel kell ismerni ugyanakkor, hogy az itt bemutatott módszerben a vizes fázisú expozíciót gondosan kerülik, így az e vizsgálati módszerből adódó BMF érték közvetlenül nem hasonlítható össze a terepvizsgálat során nyert BMF értékkel (ahol kombinálható a vízi és az étrendi expozíció).

E vizsgálati módszer e szakasza ezen a protokollon (38) alapul, és olyan új módszer, amely a C.13. vizsgálati módszer korábbi verziójában nem jelent meg. Ez az alternatív vizsgálat lehetővé teszi, hogy az étrendi expozíciós útvonalat szabályozott laboratóriumi körülmények között közvetlenül vizsgálják.

A lehetséges vizsgálóknak e vizsgálati módszer 1–14. pontját kell áttekinteniük, hogy tájékozódjanak, mikor részesítendő előnyben az étrendi expozíciós vizsgálat a vízi expozíciós vizsgálattal szemben. Az anyagokkal kapcsolatos különböző megfontolások vonatkozásában rendelkezésre állnak információk, amelyeket a vizsgálat lefolytatása előtt mérlegelni kell.

A radioaktív jelöléssel ellátott vizsgálati anyagok alkalmazását ugyanolyan megfontolások mentén kell mérlegelni, mint a vízi expozíciós módszer esetén (vö. 6. és 65. pont).

Az étrendi módszer egynél több anyag egyetlen vizsgálat keretében való elemzésére is alkalmas bizonyos kritériumok teljesülése esetén; ezeket a 112. pont fejti ki részletesebben. Az egyszerűség érdekében a módszer itt egyetlen vizsgálati anyagot elemző vizsgálatot mutat be.

Az étrendi vizsgálat sok szempontból hasonló a vízi expozíciós módszerhez, nyilvánvalóan az expozíciós útvonal kivételével. Így az itt bemutatott módszer és az előző szakaszban ismertetett vízi expozíciós módszer között számos vonatkozásban átfedés van. Lehetőség szerint kereszthivatkozás utal a korábbi szakasz vonatkozó pontjaira, de az olvashatóság és érthetőség érdekében bizonyos mennyiségű ismétlés elkerülhetetlen.

A VIZSGÁLAT ELVE

Átfolyásos vagy félstatikus körülmények alkalmazhatók (vö. 4. pont); az átfolyásos körülmények javasoltak az anyagnak vízi úton való, a vizsgálati anyaggal kiegészített táp vagy ürülék deszorpciója eredményeként előálló esetleges expozíció mérséklése érdekében. A vizsgálat két fázisból áll: felvétel (vizsgálati anyaggal kiegészített táp) és tisztulás (tiszta, kezeletlen táp) (vö. 16. pont). A felvételi fázisban a halak vizsgálati csoportját a vizsgálati anyaggal kiegészített, ismert összetételű kereskedelmi haltápon alapuló, előre meghatározott étrend szerint etetik, napi rendszerességgel. A halaknak ideális esetben valamennyi beadott tápot el kell fogyasztaniuk (vö. 141. pont). A halakat ezt követően tiszta, kezeletlen kereskedelmi haltáppal kell etetni a tisztulási időszakban. A vízi expozíciós módszerhez hasonlóan, szükség esetén egynél több, különböző kiegészített vizsgálatianyag-koncentrációknak kitett vizsgálati csoportokat lehet alkalmazni, de a nagymértékben víztaszító szerves vizsgálati anyagok többsége esetében

([1]) A vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK rendelet (HL L 396, 2006.12.30., 1. o.) alkalmazásában e kérdéssel a „Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment” című dokumentum R.7c., R.7.10.3.1. fejezete, R.7.10.4.1. fejezete, és R7.10-2. ábrája foglalkozik.

▼M7

elegendő egyetlen vizsgálati csoport (vö. 49. és 107. pont). Ha félstatikus körülményeket alkalmaznak, a halakat új közegbe és/vagy új vizsgálati kamrába kell áthelyezni a felvételi fázis végén (amennyiben a felvételi fázisban alkalmazott közeg és/vagy eszköz kimosódás következtében a vizsgálati anyaggal szennyeződött). A vizsgálati anyag halakban lévő koncentrációit a vizsgálat mindkét fázisa alatt mérik. A vizsgálati anyaggal kiegészített étrenden tartott halak csoportja (a vizsgálati csoport) mellett kontrollcsoportot is kell beállítani azonos körülmények között, és ezeket ugyanúgy kell etetni, leszámítva, hogy a kereskedelmi haltápot nem egészítik ki a vizsgálati anyaggal. E kontrollcsoport lehetővé teszi, hogy a vizsgálati anyag háttérszintjeit számszerűsítsék a vizsgálati anyagnak ki nem tett halakban, és összehasonlításul szolgál bármely, a vizsgálati csoportban megfigyelt, kezeléssel összefüggő káros hatás vonatkozásában ([1]). Ezenfelül lehetővé teszi a növekedési sebességi állandók csoportok közötti összehasonlítását, annak ellenőrzésére, hogy a beadott táp azonos mennyiségeit fogyasztották-e el (az étrendek ízletessége közötti lehetséges különbségeket szintén figyelembe kell venni a különböző növekedési sebességi állandók magyarázataként, vö. 138. pont). Fontos, hogy mind a felvételi, mind a tisztulási fázisban egyenértékű tápanyagot tartalmazó étrenddel etessék a vizsgálati és a kontrollcsoportot is.

A módszer kialakítóinak tapasztalatai alapján általában elegendő a 7–14 napig tartó felvételi fázis (38) és (39). E tartománynak úgy kellene a lehető legkisebbre csökkentenie a vizsgálat elvégzésének költségét, hogy továbbra is biztosítja a legtöbb anyagnak való elegendő expozíciót. Ugyanakkor egyes esetekben a felvételi fázis meghosszabbítható (vö. 127. pont). A felvételi fázis során az anyag koncentrációja a halban nem biztos, hogy állandósult állapotot ér el, így az adatkezelés és az e módszerből adódó eredmények szokásosan a szöveti maradékok kinetikus elemzésén alapulnak. (Megjegyzés: az állandósult állapot eléréséhez szükséges idő becslésére szolgáló egyenleteket itt alkalmazni lehet, mint a vízi expozíciós vizsgálatnál – lásd az 5. függeléket.) A tisztulási fázis akkor kezdődik, amikor a halat először etetik kiegészítetlen táppal, és szokásosan legfeljebb 28 napig tart, vagy – amennyiben az korábban következik be –, addig az időpontig, amikor a vizsgálati vegyi anyag mennyisége már nem számszerűsíthető az egész halban. A tisztulási fázis lerövidíthető vagy meghosszabbítható 28 napon túlra, a mért vegyianyag-koncentráció és a halak méretének időbeli változásától függően.

Ez a módszer lehetővé teszi a következők meghatározását: anyagspecifikus felezési idő ($t_{1/2}$, a k_2 tisztulási sebességi állandóból), a halban lévő vizsgálati anyag asszimilációs hatékonysága (felszívódás a bélből; *a*); kinetikus étrendi biomagnifikációs tényezője (BMF_K), a növekedéssel korrigált kinetikus étrendi biomagnifikációs tényezője (BMF_{Kg}), és a lipidtartalommal korrigált ([2]) kinetikus étrendi biomagnifikációs tényezője (BMF_{KL}) (és/vagy a növekedéssel és lipidtartalommal korrigált kinetikus étrendi biomagnifikációs tényező, BMF_{KgL}). A vízi expozíciós módszerhez hasonlóan, a halak tömegének a vizsgálat során bekövetkező növekedése következtében a fejlődő halakban felhígul a vizsgálati anyag, így a (kinetikus) BCF-et alulbecslik, ha nem korrigálják a növekedés tekintetében (vö. 162 és 163. pont). Ráadásul, ha a becslések szerint az állandósult állapotot elérték a felvételi fázisban, tájékoztató jellegű állandósult állapoti BMF-et lehet számolni. Rendelkezésre állnak olyan megközelítések, amelyek lehetővé teszik a kinetikus biokoncentrációs tényező (BCF_K) étrendi vizsgálatból nyert adatok alapján történő becslését (pl. (44) (45) (46) (47) (48)). Az e megközelítések mellett és ellen szóló érvek a 8. függelékben találhatók.

([1]) A legtöbb vizsgálati anyag ideális esetben nem mutatható ki a kontrollvízben. A háttérkoncentráció csak természetes körülmények között előforduló anyagok (pl. egyes fémek), illetve olyan anyagok esetén lehet releváns, amelyek mindenütt megtalálhatók a környezetben.

([2]) Ha a BMF-et egy anyag adott szervezetben mérhető koncentrációjának és a szervezet táplálékában mérhető koncentrációjának hányadosaként határozzák meg állandósult állapotban, a lipidtartalmat figyelembe kell venni azáltal, hogy a szervezet és a táp lipidtartalmára tekintettel kiigazítást végeznek, ezért ez pontosabban „korrekcióként” írható le. Ez a megközelítés eltér a szervezet előre megállapított lipidtartalmához viszonyított „normalizációtól”, amint arra a vízi expozíciós biokoncentrációs vizsgálatban sor kerül.

▼M7

A vizsgálatot elsődlegesen csekély mértékben oldható, nem poláris szerves anyagokra dolgozták ki, amelyek megközelítőleg elsőrendű felvételi és tisztulási kinetikát követnek a halakban. Amennyiben olyan anyagot vizsgálnak, amely megközelítőleg nem elsőrendű felvételi és tisztulási kinetikát követ, összetettebb modelleket kell alkalmazni (lásd az 5. függelék hivatkozásait), és biostatisztikus és/vagy farmakokinetikus szakvéleményét kell kikérni.

A BMF-et szokásosan a vizsgálati anyag egész halra (nedves tömeg) vetített elemzésével határozzák meg. Amennyiben a vizsgálat célkitűzései szempontjából releváns, konkrét szövetekből (pl. izom, máj) mintát lehet venni, ha a hal ehető és nem ehető részekre osztható (vö. 21. pont). Emellett el lehet végezni a gyomor-bél traktus eltávolítását és különálló elemzését az egész halban mérhető koncentrációhoz való hozzájárulás meghatározása érdekében a felvételi fázis végén található és a tisztulási fázis kezdetéhez közeli mintavételi pontok tekintetében, vagy anyagmérleg alapú megközelítés részeként.

A mintába felvett egész hal lipidtartalmát mérni kell, így a koncentrációk a lipidtartalomra tekintettel korrigálhatók, figyelembe véve mind az étrend, mind a hal lipidtartalmát (vö. 56. és 57. pont, valamint 7. függelék).

A vizsgálat során esetleg bekövetkező növekedés kiszámításának céljából a mintába felvett egyedek tömegét mérni és rögzíteni kell, továbbá azt az adott egyed tekintetében elemzett vegyianyag-koncentrációhoz kell kapcsolni (pl. egyedi azonosító kóddal kell feltüntetni a mintába felvett minden hal tekintetében). A halak teljes hosszát is mérni kell, ahol lehetséges ([1]). A tömegre vonatkozó adatok szükségesek a BCF-nek az étrendi vizsgálat tisztulási adatai felhasználásával készült becsléséhez is.

A VIZSGÁLATI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

A vizsgálati anyagra vonatkozó, a 3. és 22. pontban feltüntetett információt rendelkezésre kell bocsátani. Általában nincs szükség a vizsgálati anyag vízi koncentrációjával kapcsolatos analitikai módszerre; a koncentráció haltápban és halszövetben történő mérését szolgáló, kellően érzékeny módszer előírt.

A módszer egynél több anyag egyetlen vizsgálat keretében való elemzésére is alkalmas. A vizsgálati anyagoknak ugyanakkor egymással kompatibilisnek kell lenniük, hogy ne lépjenek kölcsönhatásba egymással, vagy ne változzon meg kémiai azonosságuk a haltáphoz való hozzáadásukkal. A cél az, hogy az egyes együtt vizsgálati anyagok tekintetében mért eredmények ne különbözzenek nagy mértékben azoktól az eredményektől, amelyek az egyes vizsgálati anyagok egyedi vizsgálatából adódnának. Előzetes analitikai munkával kell megállapítani, hogy mindegyik anyag visszanyerhető-e a többszörösen kiegészített táp- és halszövetmintából, i. nagy visszanyerési arány (pl. > a névleges 85 %-a) mellett és ii. a szükséges vizsgálati érzékenységgel. Az együtt vizsgált anyagok teljes dózisának el kell maradnia az esetlegesen toxikus hatást okozó kombinált koncentrációtól (vö. 51. pont). Ezenfelül a halban bekövetkező lehetséges káros hatásokat és a több anyag egyidejű vizsgálatával összefüggő potenciális kölcsönhatásokat (pl. anyagcserehatások) figyelembe kell venni a kísérlettervezés során. Kerülni kell az ionizálható anyagok egyidejű vizsgálatát. Az expozíciót tekintve ez a módszer alkalmas összetett keverékek esetén is (vö. 13. pont, jóllehet a más módszerek esetén érvényes analitikai korlátozásokat itt is alkalmazni kell).

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

A vizsgálat érvényességéhez a következő feltételeknek kell teljesülniük (vö. 24. pont):

— A vízhőmérséklet-változás kevesebb mint ± 2 °C a kezelt és a kontrollcsoportban.

([1]) A teljes hosszt is rögzíteni kell a vizsgálat során, mivel megfelelően jelzi, hogy bekövetkezett-e káros hatás.

▼M7

— Az oldott oxigén koncentrációja nem eshet 60 %-os levegőtelítettségi érték alá.

— A vizsgálati vegyi anyag haltápban lévő koncentrációja a felvételi fázis előtt és végén ± 20 %-os tartományon belül marad (mindkét időpontban legalább három minta alapján).

— Az anyag nagymértékű homogenitását a tápban a vizsgálati anyaggal kiegészített étrendre vonatkozó előzetes analitikai munkával kell bizonyítani; az anyagnak a vizsgálat kezdetekor mintavételezett legalább három koncentrációja nem térhet el ± 15 %-ot meghaladóan az átlagtól.

— A kiegészítetlen tápban, illetve a kontrollhalak szöveteiben a vizsgálati anyag a kezelt mintákhoz képest nem kimutatható, vagy csak a szokásosnak megfelelő nyomokban.

— A vizsgálat végén a kontroll- és a kezelt halak mortalitása és egyéb káros hatások/betegségek legfeljebb 10 %-ban fordulhatnak elő; amennyiben a vizsgálat bármilyen okból meghosszabbodik, a káros hatás a halak mindkét csoportjában legfeljebb havi 5 %, és összesen legfeljebb 30 % lehet. Az átlagos növekedésnek a mintába felvett halak vizsgálati és kontrollcsoportja közötti jelentős különbségei a vizsgálati anyag toxikus hatására utalhatnak.

REFERENCIAANYAGOK

Ha a laboratórium korábban még nem végezte a vizsgálatot vagy jelentős változások történtek (pl. a haltörzs vagy a beszállító változásai, más halfajok, a halak méretének, a haltápnak vagy a tápkiegészítési módszernek a jelentős változása stb.), célszerű technikai jártassági vizsgálatot lefolytatni referenciaanyag alkalmazásával. A referenciaanyagot elsődlegesen annak megállapítására használják, hogy a tápkiegészítési módszer megfelelő-e a maximális homogenitás és a vizsgálati anyag biológiai hasznosíthatóságának garantálásához. A nem poláris víztaszító anyagok esetében például hexaklór-benzolt (HCB) alkalmaztak, de a HCB veszélyessége miatt mérlegelni kell más olyan anyagok alkalmazását, amelyeket érintően a felvétel és a biomagnifikáció tekintetében megbízható adatok állnak rendelkezésre ([1]). Ha referenciaanyagot alkalmaznak, az azzal kapcsolatos alapvető információt fel kell tüntetni a Vizsgálati jegyzőkönyvben, ideértve a nevet, a tisztaságot, a CAS-számot, a szerkezetet és a toxicitási adatokat (ha rendelkezésre állnak), mint a vizsgálati anyag esetében (vö. 3. és 22. pont).

A MÓDSZER ISMERTETÉSE

Felszerelés

Az anyagokat és felszereléseket a vízi expozíciós módszernél bemutatottak szerint kell használni (vö. 26. pont). Átfolyásos vagy statikus megújítási vizsgálati rendszert kell alkalmazni, amely biztosítja, hogy elegendő mennyiségű hígítóvíz áramoljon a vizsgálati tartályokba. Az áramlási sebességet rögzíteni kell.

Víz

A vizsgálati vizet a vízi expozíciós módszernél bemutatottak szerint kell használni (vö. 27–29. pont). A vizsgálati közegnek a leírt jellemzőkkel kell rendelkeznie, minőségének pedig állandónak kell maradnia a vizsgálat során. A természetes részecsketartalomnak és teljes szervesszén-tartalomnak a lehető legalacsonyabbnak kell lennie a vizsgálat megkezdése előtt (≤ 5 mg/l részecske; ≤ 2 mg/l teljes szervesszén-tartalom). A teljes szervesszén-tartalmat csak a vizsgálat megkezdése előtt, a vizsgálati víz jellemzésének részeként kell mérni (vö. 53. pont).

([1]) A HCB szerepel a Stockholmi Egyezmény A. és C. mellékletében, valamint a környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokról szóló 850/2004/EK rendelet (HL L 158., 2004.4.30., 7. o.) I. és III. mellékletében.

▼M7

Étrend

Kereskedelmi forgalomban kapható halláp (lebegő és/vagy lassan elsüllyedő pellet) ajánlott, amelynek legalább fehérje- és zsírtartalma ismert. A tápnak egységes pelletméretűnek kell lennie, hogy fokozottabb legyen az étrendi expozíció hatékonysága, azaz a halak többet egyenek a tápból, ahelyett, hogy megeszik a nagyobb darabokat, a kisebbeket pedig nem. A pelleteknek a hal méretéhez viszonyítva megfelelő méretűnek kell lenniük a vizsgálat kezdetén (pl. durván 0,6–0,85 mm pelletátmérő alkalmazható a 3–7 cm teljes hosszúságú halak esetén, valamint 0,85–1,2 mm pelletátmérő alkalmazható a 6–12 cm teljes hosszúságú halak esetén). A tisztulási szakasz kezdetén a pellet méretét a halak növekedéséhez lehet igazítani. A megfelelő, kereskedelemben is forgalmazott tápösszetételre a 7. függelékben található példa. E módszer kialakítása során szokásosan 15–20 % (w/w) teljes lipidtartalmú vizsgálati étrendet alkalmaztak. Egyes területeken nem biztos, hogy kapható ilyen magas lipidkoncentrációjú halláp. Ilyen esetekben a vizsgálatot le lehet folytatni alacsonyabb lipidtartalmú táppal, és szükség esetén az etetési arányt kell megfelelően kiigazítani a hal egészségének megőrzéséhez (előzetes vizsgálat alapján). A vizsgálati és kontrollcsoport étrendjének teljes lipidtartalmát mérni és rögzíteni kell a vizsgálat megkezdése előtt és a felvételi fázis végén. A Vizsgálati jegyzőkönyvben fel kell tüntetni a kereskedelmi haltápbeszállító által a tápanyagok, a nedvesség, a rost és a hamu, és lehetőség szerint az ásványi anyagok, továbbá a növényvédőszer-maradékok (pl. „standard”, prioritásként kezelendő szennyező anyagok) elemzése tekintetében közölt részletes adatokat.

A táp vizsgálati anyaggal való kiegészítésekor minden erőfeszítést meg kell tenni annak érdekében, hogy biztosított legyen a homogenitás a vizsgálati étrendben. A vizsgálati csoport tekintetében a vizsgálati anyag tápban meglévő koncentrációjának megválasztása során figyelembe kell venni az analitikai módszer érzékenységét, a vizsgálati anyag toxicitását (NOEC, ha ismert), és a releváns fizikai és kémiai adatokat. Ha alkalmaznak referenciaanyagot, azt a vizsgálati anyag koncentrációjának 10 %-a körüli koncentrációval kell bevezetni (de mindenesetre a lehető legalacsonyabb szinten), figyelemmel az elemzés érzékenységére (pl. a hexaklór-benzol esetében a tápban mért 1–100 μg/g koncentrációt elfogadhatónak tekintették; vö. (47) a HCB asszimilációs hatékonyságát érintő további információ tekintetében).

A halláp számos módszerrel kiegészíthető a vizsgálati anyaggal, az anyag fizikai tulajdonságai és oldhatósága függvényében (lásd a 7. függeléket a tápkiegészítési módszerek további részletei tekintetében):

— Ha az anyag trigliceridekben oldható és stabil, az anyagot kis mennyiségű halolajban vagy növényi étolajban kell feloldani, mielőtt a haltápba bekevernék. Ebben az esetben törekedni kell arra, hogy ne készítsenek túl magas lipidtartalmú adagot, figyelembe véve a kiegészített táp természetes lipidtartalmát; így a vizsgálati anyag tápban történő megfelelő eloszlását és homogenitását ismerten biztosító legkisebb mennyiségű olajat kell hozzáadni, vagy

— A tápot megfelelő szerves oldószer alkalmazásával kell kiegészíteni, ameddig a homogenitás és a biológiai hasznosíthatóság nem kerül veszélybe (lehetséges, hogy a vizsgálati anyag (mikro)kristályokká alakul a tápban az oldószer párolgásának következtében, és nem könnyen bizonyítható, hogy ez nem következett be; vö. (49)), vagy

— Nem viszkózus folyadékot kell adni közvetlenül a haltáphoz, de azt jól el kell keverni a homogenitás előmozdítása és a megfelelő asszimiláció megkönnyítése érdekében. A keverési technikának biztosítania kell a kiegészített táp homogenitását.

▼M7

Néhány esetben, pl. kevésbé víztaszító vizsgálati anyagoknál valószínűbb, hogy deszorbeálnak a tápból, ezért szükség lehet arra, hogy az elkészített pelleteket kis mennyiségű kukorica-/halolajjal bevonják (lásd 142. pont). Ilyen esetekben a kontrolltápot hasonlóan kell kezelni, és a végül elkészített tápot kell használni a lipidtartalom mérésénél.

Ha referenciaanyagot alkalmaznak, az azzal kapcsolatos eredményeknek összehasonlíthatóknak kell lenniük az ugyanilyen körülmények között, hasonló etetési aránnyal végzett vizsgálatok szakirodalmi adataival (vö. 45. pont) és a referenciaanyag-specifikus paramétereknek meg kell felelniük a 113. pontban megfogalmazott, vonatkozó kritériumoknak (3., 4. és 5. pont).

Ha olajat vagy hordozó oldószert használnak a vizsgálati anyag vivőanyagaként, e vivőanyag ugyanolyan mennyiségét a kontrollcsoport étrendjébe is bele kell keverni (a vizsgálati anyag nélkül), hogy fenntartsák a kiegészített étrenddel való egyenértékűséget. Fontos, hogy mind a felvételi, mind a tisztulási fázisban egyenértékű tápanyagot tartalmazó étrenddel etessék a vizsgálati és a kontrollcsoportot is.

A kiegészített tápot olyan körülmények között kell tárolni, hogy fennmaradjon a vizsgálati anyag stabilitása a tápkeverékben (pl. hűtés), és e körülményeket fel kell tüntetni a Vizsgálati jegyzőkönyvben.

A halfajok kiválasztása

A vízi expozíciónál meghatározott halfajokat lehet használni (vö. 32. pont és 3. függelék). Általánosságban szivárványos pisztrángot (*Oncorhynchus mykiss*), pontyot (*Cyprinus carpio*), amerikai csellét (*Pimephales promelas*) használtak a szerves anyagokat érintő étrendi bioakkumulációs vizsgálatokban még e vizsgálati módszer közzététele előtt. A vizsgálati fajok olyan étkezési szokásokkal kell rendelkezzenek, hogy a beadott tápadagot gyorsan elfogyasszák, annak biztosítása érdekében, hogy a vizsgálati anyag tápbeli koncentrációját befolyásoló tényezőket (pl. vízbe szivárgás és vízi expozíció lehetősége) a minimálisra szorítsák. Az ajánlott méret/tömegtartományba tartozó halakat kell használni (vö. 3. függelék). A halak nem lehetnek olyan kicsik, hogy a méretük gátolja az egyedenkénti könnyű analízist. A halfajok gyors növekedéssel járó életszakaszban történő vizsgálata bonyolíthatja az adatok kiértékelését, és a nagy növekedési sebesség befolyásolhatja az asszimilációs hatékonyság kiszámítását ([1]).

A halak tartása

Az akklimatizációra, a mortalitásra és a betegségre vonatkozó elfogadhatósági kritériumok megegyeznek a vízi expozíciós módszernél a vizsgálat lefolytatása előtti időszak vonatkozásában ismertetettekkel (vö. 33–35. pont).

A VIZSGÁLAT ELVÉGZÉSE

Elővizsgálati munka és dózisbehatároló vizsgálat

Elővizsgálati analitikai munkára van szükség az anyag kiegészített tápból/halszövetből történő visszanyerésének igazolására. A tápbeli megfelelő koncentráció megválasztására irányuló dózisbehatároló vizsgálat nem mindig szükséges. Annak igazolása céljából, hogy nem figyeltek meg káros hatásokat, illetve a kiegészített táp ízletességének, az analitikai módszer halszövet és táp szempontjából vett érzékenységének, valamint a tisztulási fázis során a megfelelő etetési arány és mintavételezési időközök megválasztásának stb. értékelése érdekében előzetes etetési kísérleteket lehet végezni, de ezek nem kötelezőek. Az előzetes

([1]) A felvételi fázis során bekövetkezett gyors növekedés esetén a valódi etetési arány az expozíció elején beállított alá csökken.

▼M7

vizsgálat hasznos lehet a tisztulási szakaszban mintába veendő halak számának becsléséhez. Ennek eredményeként lényegesen csökkenhet az alkalmazott halak száma, különösen azon vizsgálati anyagok tekintetében, amelyek kifejezetten alkalmasak anyagcserére.

Az expozíció körülményei

A felvételi fázis tartama

7–14 napos felvételi fázis általában elegendő; ezalatt egy halcsoportot a kontrolltáppal kell etetni, egy másikat a vizsgálati táppal, naponta, a vizsgálati faj és a kísérleti körülmények függvényében előre meghatározott adagban, pl. a testtömeg (nedves tömeg) 1–2 %-ában szivárványos pisztráng esetén. Az etetési arányt úgy kell megválasztani, hogy el lehessen kerülni a gyors növekedést és a lipidtartalom számottevő emelkedését. Szükség esetén a felvételi fázis meghosszabbítható korábbi vizsgálatok gyakorlati tapasztalatainak vagy a vizsgálati (vagy hasonló) anyag halban megfigyelt felvétele/tisztulása ismeretének függvényében. A vizsgálat kezdete a vizsgálati anyaggal kiegészített táppal való első etetés időpontja. Egy kísérleti nap az etetés időpontjától röviddel (pl. egy órával) a következő etetés időpontja előttig tart. A felvétel első kísérleti napja tehát a kiegészített táppal való első etetés időpontjában kezdődik, és röviddel a kiegészített táppal való második etetés előtt ér véget. A gyakorlatban a felvételi fázis röviddel (pl. egy órával) a kiegészítetlen vegyi anyaggal való első etetés előtt ér véget, mivel a hal továbbra is emészti a kiegészített tápot és felszívja a vizsgálati anyagot a közbeeső 24 órában. Fontos biztosítani, hogy a vizsgálati anyaggal az analitikai módszerre tekintettel a test kellően magas (nem toxikus) anyagterhelését érjék el, hogy legalább egy nagyságrendnyi csökkenés mérhető legyen a tisztulási fázisban. Különleges esetekben (28 napig) meghosszabbított felvételi fázis is alkalmazható, további mintavétel mellett, hogy betekintést lehessen nyerni a felvételi kinetikába. A felvétel során a halban mért koncentráció nem feltétlenül éri el az állandósult állapotot. Az állandósult állapot eléréséhez szükséges idő, mint a halban mért értékelhető koncentráció eléréséhez szükséges valószínűsíthető időtartamra utaló jel becslésére szolgáló egyenleteket itt alkalmazni lehet, mint a vízi expozíciós vizsgálatnál (vö. 5. függelék).

Néhány esetben tudott lehet, hogy – akár gyenge analitikai érzékenység, akár alacsony asszimilációs hatékonyság miatt – az anyag hal általi felvételére nem lesz elég a 7–14 nap ahhoz, hogy a tápban alkalmazott koncentrációval kellően magas halban mért koncentrációt lehessen elérni, hogy elemezhető legyen legalább egy nagyságrendnyi csökkenés a tisztulási szakaszban. Ilyen esetekben előnyös lehet az eredeti etetési fázist 14 napon túlra meghosszabbítani, vagy kifejezetten a nagymértékben feldolgozható anyagok esetében magasabb étrendi koncentrációt kell fontolóra venni. Ugyanakkor óvatosan kell eljárni, hogy a test anyagterhelése a felvétel során a (becsült) krónikus hatást nem okozó koncentráció (NOEC) alatt maradjon a halszövetben (vö. 138. pont).

A tisztulási fázis időtartama

A tisztulás szokásosan 28 napig tart, és akkor kezdődik, amikor a vizsgálati csoportba tartozó halakat tiszta, kezeletlen táppal etetik a felvételi fázist követően. A tisztulási fázis a „kiegészítetlen” táppal való első etetéssel kezdődik, és nem közvetlenül az utolsó „kiegészített” táppal való etetést követően, mivel a hal továbbra is emészti a kiegészített tápot és felszívja a vizsgálati anyagot a közbeeső 24 órában, amint az a 126. pontban is szerepel. Ennélfogva a tisztulási fázisban az első mintát rövid idővel a kiegészítetlen táppal való második etetés előtt kell venni. E tisztulási szakasz célja azon anyagok felderítése, amelyek potenciális felezési ideje legfeljebb 14 nap, ami összhangban áll a bioakkumulatív anyagok felezési idejével ([1]), így a 28 napra két felezési idő jut ilyen

([1]) Vízi expozíciós vizsgálatban a 14 napos felezési idő kb. 10 000 L/kg BCF-nek felel meg, 1 g-os halak és ennek megfelelő, mintegy 500 L/kg/d felvételi sebesség mellett (a Sijm és munkatársai féle egyenlet szerint (46)).

▼M7

anyagok esetében. A nagyon nagy mértékben bioakkumulatív anyagok esetében előnyös lehet a tisztulási fázis meghosszabbítása (ha az előzetes vizsgálat erre utal).

Ha az anyag nagyon lassan ürül ki, és így pontos felezési idő nem határozható meg a tisztulási szakaszban, az információ még mindig elengedő lehet értékelési célokra a nagyfokú bioakkumuláció jelzésére. Ezzel ellentétben, ha egy anyag olyan gyorsan ürül ki, hogy megbízható nulla időpillanati koncentráció (a felvétel vége/tisztulás kezdetekori koncentráció, $C_{0,d}$) és k_2 nem származtatható, el lehet végezni a k_2 konzervatív becslését (vö. 7. függelék).

Ha a hal korábbi intervallumok (pl. 7 vagy 14 nap) során végzett elemzései azt mutatják, hogy az anyag a 28 napos teljes periódus előtt a számszerűsítési szintek alatt ürült ki, a további mintavételezés megszakítható és a vizsgálat lezárható.

Egyes esetekben a vizsgálati anyagnak esetleg nem mérhető a felvétele a felvételi időszak végén (vagy a második tisztulási mintában). Ha igazolható, hogy i. a 113. pontban foglalt érvényességi kritériumok teljesültek, és ii. a felvétel hiánya nem a vizsgálat egyéb hiányosságaiból ered (pl. nem elég hosszú felvételi idő, a tápkiegészítési technika hiányossága, amelynek következtében gyengül a biológiai hasznosíthatóság, az analitikai módszer nem érzékeny, a hal nem fogyasztja el a tápot stb.), be lehet fejezni a vizsgálatot anélkül, hogy újra le kellene azt folytatni hosszabb felvételi időszakkal. Ha az előzetes munka arra utalt, hogy ez lehet a helyzet, az anyagmérleg megközelítés részeként tanácsos lehet az ürülék elemzése, ha lehetséges, emésztetlen vizsgálati anyag feltárása érdekében.

A vizsgálati halak száma

A vízi expozíciós vizsgálatnál leírtak szerint hasonló tömegű és hosszúságú halakat kell kiválasztani, úgy, hogy a legkisebbek ne legyenek kisebbek a legnagyobb hal tömegének kétharmadánál (vö. 40–42. pont).

A vizsgálandó halak teljes számát a mintavételi ütemterv szerint kell megválasztani (minimum egy mintát kell venni a felvételi fázis végén, és négy–hat mintát a tisztulási fázisban, de a fázisok időtartamának függvényében), figyelembe véve az analitikai módszer érzékenységét, a felvételi fázis végén (előzetes ismeretek alapján) valószínűleg elérendő koncentrációt, és a tisztulás időtartamát (ha a korábbi ismeretek lehetővé teszik a becslést). Minden egyes alkalommal öt–tíz halat kell mintavételezni, és a növekedési paramétereket (tömeg és teljes hossz) a kémiai vagy lipidanalízis előtt kell megmérni.

A halak körében az inherens méretbeli, a növekedési sebességet érintő és a fiziológiai különbségek, továbbá az egyes halak által elfogyasztott beadott táp valószínű mennyiségi eltérése miatt legalább öt halat mintába kell venni az egyes intervallumok során a vizsgálati csoportból és ötöt a kontrollcsoportból, hogy megfelelően meg lehessen állapítani az átlagos koncentrációt és annak változékonyságát. A felhasznált halak közötti eltérések valószínűleg nagyobb mértékben járulnak hozzá a vizsgálatban az általános akaratlan változékonysághoz, mint az alkalmazott analitikai módszerekben rejlő változékonyság, és ezáltal indokolja a mintavételezési pontonkénti legfeljebb tíz hal használatát egyes esetekben. Ugyanakkor, amennyiben a vizsgálati anyag kontrollhalakban lévő háttérkoncentrációja nem mérhető a tisztulási fázis kezdetén, két–három kontrollhal kémiai elemzése a végső mintavételi alkalommal csak addig elegendő, ameddig a többi kontrollhalat minden mintavételi ponton továbbra is mintavételezik a tömeg és teljes hossz tekintetében (azért, hogy ugyanolyan számú halat mintavételezzenek a vizsgálati és a kontrollcsoportban a növekedés tekintetében). A halakat egyedileg kell tárolni, tömegüket és teljes hosszukat mérni (még akkor is, ha a mintavételi eredmények szempontjából későbbi összevonás szükséges).

▼M7

A például 28 napos tisztulási időtartamot és öt tisztulási mintavételt tartalmazó standard vizsgálat tekintetében ez összesen 59–120 halat jelent a vizsgálati csoportból és 50–110 halat a kontrollcsoportból, feltételezve, hogy az anyagra vonatkozó analitikai módszer lehetővé teszi a lipidanalízis ugyanazon a halon történő elvégzését. Ha a lipidanalízis nem végezhető el ugyanazon a halon, mint a kémiai analízis, és a kontrollhalak kizárólag lipidanalízishez való felhasználása szintén nem megvalósítható (vö. 56. pont), további 15 halra lesz szükség (háromra a vizsgálat kezdetekor a törzsállományból, háromra a tisztulási fázis kezdetekor a kontroll- és vizsgálati csoport mindegyikéből és háromra a kísérlet végén a kontroll- és vizsgálati csoportok mindegyikéből). A mintavételezési ütemtervre és a halak számára vonatkozó példa a 4. függelékben található.

Betelepítés

A vízi expozíciós módszernél bemutatottak szerint hasonlóan magas víz–hal arányt kell alkalmazni (vö. 43. és 44. pont). Jóllehet a hal–víz betelepítési arányok nem gyakorolnak hatást az expozíciós koncentrációra ebben a vizsgálatban, literenként naponta 0,1–1,0 g hal (nedves tömeg) betelepítési arány ajánlott a megfelelő oldottoxigén-koncentrációk fenntartása és a vizsgálati szervezeteket érő stressz minimálisra csökkentése érdekében.

Vizsgálati étrend és etetés

Az akklimatizációs időszakban a halakat megfelelő, a fent leírt étrend szerint kell etetni (117. pont). Ha a vizsgálatot átfolyásos körülmények között végzik, az áramlást az etetés idejére fel kell függeszteni.

A vizsgálat során a vizsgálati csoportnak adott étrendnek meg kell felelnie a fent meghatározottnak (116–121. pont). Az anyagspecifikus tényezők, az analitikai érzékenység, az étrendben környezeti feltételek mellett várható koncentráció, valamint a krónikus toxicitási szintnek/a test anyagterhelésének figyelembevétele mellett a kiegészítési célkoncentráció megválasztása során tekintettel kell lenni a táp ízletességére (hogy a halak megegyék). A vizsgálati anyag névleges kiegészítési koncentrációját fel kell tüntetni a Vizsgálati jegyzőkönyvben. A tapasztalatok szerint a kiegészítési koncentrációk a 1–1000 μg/g közötti tartományban olyan vizsgálati anyagok tekintetében jelentenek gyakorlati munkatartományt, amelyek nem mutatnak specifikus toxikus mechanizmust. A nem specifikus mechanizmuson keresztül reagáló anyagok esetében a szöveti maradékértékek nem haladhatják meg az 5 μmol/g lipidet, mivel az e feletti maradékok valószínűsíthetően krónikus hatást okoznak (19) (48) (50) ([1]). Más anyagok esetén gondoskodni kell arról, hogy a halmozott expozíció nyomán ne alakuljanak ki káros hatások (vö. 127. pont). Ez kimondottan igaz, ha egynél több anyagot vizsgálnak egyidejűleg (vö. 112. pont).

A haltáp háromféleképpen egészíthető ki a vizsgálati anyag megfelelő mennyiségével, amint az a 119. pontban és a 7. függelékben szerepel. A táp kiegészítésének módszereit és eljárásait fel kell tüntetni a Vizsgálati jegyzőkönyvben. A kontrollhalakat kezeletlen táppal kell etetni, amelynek ugyanolyan mennyiségű kiegészítetlen olajos vivőanyagot kell tartalmaznia, ha ilyet a kiegészített táp esetében alkalmaztak a felvételi fázisban, vagy „tiszta” oldószerrel kezelt táppal, ha a vizsgálati csoport tápjának elkészítéséhez oldószer vivőanyagot használtak. A kezelt és kezeletlen tápot legalább három példányban kell analitikailag mérni a vizsgálati anyag koncentrációjára tekintettel a vizsgálat megkezdése előtt és a felvételi fázis végén. A kezelt tápnak való expozíciót (felvételi fázis) követően a halakat (mindkét csoportban) kezeletlen táppal kell etetni (tisztulási fázis).

A halakat előre meghatározott adaggal kell etetni (a faj függvényében, pl. naponta a nedves testtömeg 1–2 %-ának megfelelő mennyiséggel a szivárványos pisztráng esetében). Az etetési arányt úgy kell megválasztani, hogy el lehessen

([1]) Mivel az aktuális belső koncentrációkat csak a vizsgálat végrehajtását követően lehet meghatározni, a várható belső koncentrációt becsülni kell (pl. a várható BMF és a tápban meglévő koncentráció alapján; vö. A5.8. egyenlet az 5. függelékben).

▼M7

kerülni a gyors növekedést és a lipidtartalom számottevő emelkedését. Az etetés kísérlet során beállított pontos arányát fel kell jegyezni. Az első etetést a törzsállomány tömegének a közvetlenül a vizsgálat megkezdése előtt tervezett méréséhez kell igazítani. A kísérlet során bekövetkező növekedés figyelembevétele érdekében a táp mennyiségét az egyes mintavételi alkalmakkor mintavételezett halak nedves tömegéhez kell igazítani. A vizsgálati és kontrolltartályokban található halak tömege és hossza megbecsülhető az egyes mintavételi alkalmakkor használt halak tömege és teljes hossza alapján; a vizsgálati és kontrolltartályokban maradó halak tömegét és hosszát nem kell megmérni. Fontos, hogy a kísérlet során fenntartsák ugyanazt az etetési arányt.

Az etetést meg kell figyelni, hogy meggyőződjenek arról, a halak láthatóan elfogyasztják a beadott tápot, annak garantálására, hogy a számításokhoz megfelelő táplálékfelvételi sebességet alkalmazzanak. Az előzetes etetési kísérleteket vagy korábbi tapasztalatokat figyelembe kell venni, hogy olyan etetési arányt válasszanak, amely biztosítja, hogy a napi egyszeri etetés során beadott valamennyi táp elfogyjon. Ha következetesen marad el nem fogyasztott táp, célszerű az adagot egy további etetési időre elosztani minden kísérleti napon (tehát pl. a napi egyszeri etetést felváltani a kétszeri, fele adagot tartalmazó etetéssel). Ha erre van szükség, a második etetést előre meghatározott időpontban kell elvégezni, és azt úgy kell ütemezni, hogy a halak mintavételezése előtt a lehető legtöbb idő teljen el (pl. a második etetés idejét a kísérleti nap első felére kell tenni).

Jóllehet a halak általában gyorsan elfogyasztják a tápot, fontos annak biztosítása, hogy a vegyi anyag adszorbeálódjon a táphoz. Törekedni kell annak elkerülésére, hogy a vizsgálati anyag kioldódjon a tápból a vízbe és ezáltal a halat az étrendi út mellett a vizsgálati anyag vízi koncentrációinak tegye ki. Ez úgy érhető el, hogy az el nem fogyasztott tápot (és az ürüléket) az etetést követő egy órán, de lehetőség szerint 30 percen belül eltávolítják a vizsgálati és kontrolltartályokból. Ezenfelül használható olyan rendszer, amelyben a vizet folyamatosan tisztítják aktívszén-szűrővel, amely elnyel bármilyen „oldott” szennyező anyagot. Az átfolyásos rendszerek segíthetnek a táp részecskéinek és az oldott anyagoknak a gyors kiöblítésében ([1]). Egyes esetekben a csekély mértékben módosított kiegészítetttáp-készítési technika segíthet e probléma enyhítésében (lásd a 119. pontot).

Fény és hőmérséklet

Amint a vízi expozíciós módszernél is (vö. 48. pont), 12–16 órás megvilágítási idő javasolt, és a hőmérsékletnek megfelelőnek (± 2 °C) kell lennie a vizsgálathoz használt fajok számára (vö. 3. függelék). A megvilágítás típusának és jellemzőinek ismertnek kell lenni, és azt dokumentálni kell.

Kontrollcsoportok

Egy kontrollcsoportot kell alkalmazni, és a halakat ugyanakkora adaggal kell etetni, mint a vizsgálati csoportot, de a tápban nem lehet jelen a vizsgálati anyag. Ha olajat vagy oldószer vivőanyagot használtak a táp kiegészítésére a vizsgálati csoportban, a kontrollcsoportnál ugyanilyen módon kell eljárni, leszámítva, hogy nem lehet jelen vizsgálati anyag, így a vizsgálati és a kontrollcsoport étrendje egyenértékű (vö. 121. és 139. pont).

([1]) A vizsgálati anyag vizsgálati közegben való, a hal általi kiválasztásnak vagy a tápból való kioldódásnak köszönhető jelenléte nem küszöbölhető ki teljes mértékben. Ezért az egyik lehetőség az, hogy megmérik az anyag koncentrációját a vízben a felvételi időszak végén, különösen ha félstatikus kialakítást alkalmaznak, annak megállapítása érdekében, hogy sor kerülhetett-e vízi expozícióra.

▼M7

A vízminőség mérésének gyakorisága

A vízi expozíciónál leírt feltételek itt is érvényesek, kivéve, hogy a teljes szervesszén-tartalmat csak a vizsgálat megkezdése előtt, a vizsgálati víz jellemzésének részeként kell mérni (vö. 53. pont).

Hal- és tápmintavételezés és -analízis

Tápminták analízise

A vizsgálati és kontrolltáp mintáit legalább három példányban kell analizálni a vizsgálati anyagra és a lipidtartalomra tekintettel, legalább a felvételi fázis kezdete előtt és a végén. Az analitikai módszereket és a táp homogenitását biztosító eljárásokat fel kell tüntetni a Vizsgálati jegyzőkönyvben.

A mintákat a vizsgálati anyag tekintetében az elfogadott és validált módszer alapján kell analizálni. Előzetes vizsgálatot lehet végezni a meghatározási határ, a százalékos visszanyerés, a kölcsönhatások és a tervezett mintamátrixban az analitikai változékonyság megállapítására. Radioaktív jelöléssel ellátott anyagok vizsgálata esetén hasonló megfontolásokat kell mérlegelni, mint a vízi expozíciónál, de a víz analízisének helyébe a táp analízise lép (vö. 65. pont).

Halak analízise

Az egyes halminta-vételi alkalmakkor 5–10 egyedet kell mintába venni a kitett és a kontrollcsoportokból (bizonyos esetekben a kontrollhalak száma csökkenthető, vö. 134. pont).

A mintavételi alkalmakat minden kísérleti napon ugyanakkorra kell időzíteni (az etetési időhöz viszonyítva), és azokat úgy kell ütemezni, hogy minimálisra csökkenjen annak valószínűsége, hogy táp maradjon a bélben a felvételi fázis alatt és a tisztulási fázis korai szakaszában, annak megelőzése érdekében, hogy a teljes vizsgálatianyag-koncentrációt hamis adatok alapján határozzák meg (azaz a mintába felvett halakat el kell távolítani a kísérleti nap végén; figyelembe véve, hogy a kísérleti nap az etetéskor kezdődik és a következő etetéskor ér véget, megközelítőleg 24 órával később. A tisztulási fázis a kiegészítetlen táppal való első etetéssel kezdődik (vö. 128. pont). A tisztulási fázis első mintája (amelyet röviddel a kiegészítetlen táppal való második etetés előtt vesznek) fontos, mivel e mérésből kiindulva egy nappal visszamenőleges extrapolációt alkalmaznak a nulla időpillanati koncentráció becslésére ($C_{0,d}$, a felvétel végén/tisztulás kezdetén a halban lévő koncentráció). Fakultatívan eltávolítható a hal gyomor-bél traktusa, és elkülönítetten analizálható a felvétel végén és a tisztulás 1. és 3. napján.

Az egyes mintavételi alkalmakkor a halakat ki kell venni mindkét vizsgálati edényből, és a vizes módszerben leírtakkal megegyező módon kell kezelni (vö. 61–63. pont).

A vizsgálati anyag koncentrációit az egész halban (nedves tömeg) legalább a felvételi fázis végén és a tisztulási fázis során mérni kell, mind a kontroll-, mind a vizsgálati csoportban. A tisztulási fázisban négy–hat mintavételi pont ajánlott (pl. az 1., a 3., a 7., a 14. és a 28. napon). Fakultatívan további mintavételi pont vehető fel 1–3 napnyi felvétel után, hogy az asszimilációs hatékonyságot meg lehessen becsülni a felvétel lineáris fázisából, míg a hal még az expozíciós időszak elején van. Az ütemtervtől két főbb eltérés lehet: i. ha meghosszabbított felvételi fázist alkalmaznak a felvételi kinetika vizsgálása céljából, további mintavételi pontokra van szükség a felvételi fázisban, így további halakat kell a vizsgálatba bevonni (vö. 126. pont); ii. ha a vizsgálat a felvételi fázis végén nem mérhető felvétel miatt lezárul (vö. 131. pont). A mintába felvett halegyedek tömegét (és teljes hosszát) mérni kell, hogy meg lehessen határozni a

▼M7

növekedési sebességi állandókat. Az anyag konkrét halszövetben lévő koncentrációját is mérni lehet a felvétel végén és kiválasztott tisztulási időpontokban. Radioaktív jelöléssel ellátott anyagok vizsgálata esetén hasonló megfontolásokat kell mérlegelni, mint a vízi expozíciónál, de a víz analízisének helyébe a táp analízise lép (vö. 65. pont).

Referenciaanyagok időszakos alkalmazása esetén (vö. 25. pont) lehetőség szerint a koncentrációkat a vizsgálati csoportban a felvételi fázis végén és a vizsgálati anyag szempontjából meghatározott valamennyi tisztulási időpontban mérni kell (egész hal); a koncentrációkat a kontrollcsoportokban csak a felvétel végén kell analizálni (egész hal). Bizonyos körülmények között (például ha a vizsgálati anyagra és a referenciaanyagra vonatkozó analitikai módszerek nem összeegyeztethetők, és ezért további halakra lenne szükség a mintavételi ütemterv betartásához), más megközelítést lehet alkalmazni a következők szerint, a további szükséges halak számának minimálisra csökkentése érdekében. A referenciaanyag koncentrációit a tisztulás során csak az 1. és 3. napon és két további mintavételi pontban kell mérni, amelyeket úgy kell megválasztani, hogy a nulla időpillanati koncentráció ($C_{0,d}$) és a k_2 megbízhatóan becsülhető legyen a referenciaanyag tekintetében.

Ha lehetséges, az egyes halak lipidtartalmát minden mintavételi alkalommal, vagy legalább a felvételi fázis elején és végén, illetve a tisztulási fázis végén meg kell határozni (vö. 56. és 67. pont). Az analitikai módszertől függően (vö. 67. pont és 4. függelék), lehetőség van ugyanazt a halat használni a lipidtartalom és a vizsgálatianyag-koncentráció meghatározásához. Ez a halak számának minimálisra csökkentése miatt javasolt. Ugyanakkor, amennyiben ez nem lehetséges, a vízi expozíciós módszernél leírt megközelítés alkalmazható (lásd az 56. pontot ezen alternatív lipidmérési lehetőségek tekintetében). A lipidtartalom számszerűsítésére alkalmazott módszert dokumentálni kell a Vizsgálati jegyzőkönyvben.

Az analitikai módszer minősége

Kísérleti ellenőrzéseket kell végezni az anyagspecifikus analitikai módszer specifikusságának, pontosságának és utánozhatóságának, valamint a vizsgálati anyag tápból és halból való visszanyerésének biztosítására.

A halak növekedésének mérése

A vizsgálat kezdetén a törzsállományból vett halmintát kell lemérni tömeg (és teljes hossz) tekintetében. E halakat röviddel (pl. egy órával) azelőtt kell mintavételezni, hogy az első kiegészített tápot beadnák, és azokat a 0. kísérleti naphoz kell rendelni. A halak számának ebben a mintában legalább annyinak kell lennie, mint a vizsgálat során vett mintákban. Ezek némelyike megegyezhet a lipidanalízishez a felvételi fázis kezdete előtt használt halakkal (vö. 153. pont). Az egyes mintavételekkor a halak tömegét és hosszát meg kell mérni. Az egyes halak esetében a mért tömeget és hosszt össze kell kapcsolni az elemzett vegyi anyag koncentrációjával (és adott esetben a lipidtartalommal), például a mintába felvett egyes halakra alkalmazott egyedi azonosító kóddal. E mintába felvett halak mérései a vizsgálati és kontrolltartályokban maradó halak tömegének és hosszának becsléséhez használhatók.

A kísérlet értékelése

A mortalitást naponta meg kell figyelni és rögzíteni kell. Emellett a káros hatásokat is meg lehet figyelni, például az abnormális viselkedést vagy a pigmentációt; ezeket rögzíteni kell. A halak akkor tekinthetők élettelennek, ha nem látható semmilyen légzőmozgás és az enyhe mechanikus stimulációra sincs reakció. Az élettelen vagy egyértelműen elhullásközeli állapotban lévő halat el kell távolítani.

▼M7

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Eredmények feldolgozása

A vizsgálati eredményeket a tisztulási sebességi állandónak (k_2) a hal nedves össztömege függvényében történő kiszámítására használják. A növekedési sebességi állandót (k_g) a hal tömege növekedésének átlaga alapján számítják ki, és abból adható meg a növekedéssel korrigált tisztulási sebességi állandó (k_{2g}) szükség esetén. Rögzíteni kell továbbá az asszimilációs hatékonyságot (aa bélből való felszívódást), a kinetikus biomagnifikációs tényezőt (BMF_K) (szükség esetén a növekedéssel korrigálva, BMF_{Kg}), annak lipidtartalommal korrigált értékét (BMF_{KL} vagy BMF_{KgL}, ha a növekedés okozta hígulásra tekintettel korrigálják) és az etetési arányt. Emellett becsülhető a felvételi fázisban az állandósult állapot eléréséhez szükséges idő (pl. az állandósult állapot 95 %-a vagy $t_{95} = 3{,}0/k_2$), és felvehető az állandósult állapoti BMF (BMF_{SS}) (vö. 105. és 106. pont és az 5. függelék), ha a t_{95} érték arra utal, hogy az állandósult állapot valószínűleg megvalósult. Ugyanazt a lipidkorrekciót kell alkalmazni erre a BMF_{SS}-re, mint a kinetikailag származtatott BMF-re (BMF_K) a lipidtartalommal korrigált érték (BMF_{SSL}) megadása érdekében (figyelembe kell venni, hogy nincs elfogadott eljárás az állandósult állapoti BMF növekedés okozta hígulásra tekintettel történő korrigálására). Az e számításokkal kapcsolatos képletek és példák a 7. függelékben találhatók. Rendelkezésre állnak megközelítések a kinetikus biokoncentrációs tényező (BCF_K) becslésére az étrendi vizsgálatból nyert adatok alapján. Ezt a 8. függelék tárgyalja.

A halak tömegére/hosszára vonatkozó adatok

A halegyedek nedves tömegét és hosszát minden időtartam tekintetében külön kell feltüntetni a táblázatban a vizsgálati és a kontrollcsoportok vonatkozásában, a felvételi fázis minden mintavételi napjára (a törzsállomány esetén a felvétel kezdetén; a kontrollcsoport és a vizsgálati csoport esetén a felvétel végén és – ha van ilyen mintavétel – a korai fázisban, azaz a felvétel 1–3. napján, továbbá a tisztulási fázisban, pl. az 1., 2., 4., 7., 14., 28. napon a kontroll- és vizsgálati csoport esetén). A növekedés és a növekedés okozta hígulás mérésére a tömeg az előnyben részesített mérték. Az adatok növekedés okozta hígulásra tekintettel történő korrigálásához használt módszer(eke)t lásd alább (162. és 163. pont) és az 5. függelékben.

A vizsgálati anyagok koncentrációja a halra vonatkozó adatokban

A halegyedekben (vagy összevont halmintákban, ha az egyedi mérés nem lehetséges) található vizsgálatianyag-maradékokra vonatkozó méréseket nedves tömeg koncentrációban (w/w) kifejezve kell táblázatba foglalni a vizsgálati és a kontrollhalak tekintetében az egyes mintavételi alkalmakra vonatkoztatva. Ha lipidanalízist is végeztek minden mintába felvett halon, az egyedi lipidtartalommal korrigált koncentrációkat lipidkoncentrációban (w/w lipid) kifejezve lehet származtatni és táblázatba foglalni.

— A halegyedekben (vagy összevont halmintákban, ha az egyedi mérés nem lehetséges, vö. 66. pont) mért vizsgálatianyag-maradékokat a tisztulási időszakban átváltják természetes alapú logaritmusaikra, és az idő függvényében (nap) ábrázolják. Ha az ábra szemmel láthatóan egyértelmű kiugró értékeket mutat, statisztikailag érvényes kiugróérték-tesztet lehet alkalmazni a hamis adatpontok törlésére, valamint ezek mellőzését indokolni kell.

— A ln(koncentráció)/tisztulás (nap) függvény adatai tekintetében legkisebb négyzetes lineáris korrelációt számítanak. Az egyenes meredekségét és metszését mint teljes tisztulási sebességi állandót (k_2) és a származtatott nulla időpillanati koncentráció ($C_{0,d}$) természetes alapú logaritmusát kell rögzíteni (vö. 5. függelék és 7. függelék a további adatok tekintetében). Amennyiben ez nem lehetséges, mivel a koncentrációk a második tisztulási mintában a meghatározási határ alatt vannak, elvégezhető a k_2 konzervatív becslése (vö. 7. függelék).

— Az egyenes meredekségének és metszésének szóródásait standard statisztikai eljárásokkal kell kiszámítani, valamint értékelni kell és be kell mutatni az ezen eredmények körüli 90 %-os (vagy 95 %-os) konfidencia-intervallumokat.

▼M7

— Ki kell számítani a felvétel utolsó napja vonatkozásában a halban mért koncentráció átlagát is (mért nulla időpillanati koncentráció, $C_{0,m}$), és azt össze kell hasonlítani a $C_{0,d}$származtatott értékkel. Amennyiben a származtatott érték nem éri el a mért értéket, a különbség arra utalhat, hogy emésztetlen kiegészített táp található a bélben. Ha a származtatott érték sokkal magasabb, mint a mért érték, ez arra utalhat, hogy a tisztulási adatok lineáris regressziójából származtatott értékek hibásak és azokat újra kell értékelni (lásd a 7. függeléket).

Tisztulási sebesség és biomagnifikációs tényező

A biomagnifikációs tényező adatokból történő kiszámítása érdekében először is az asszimilációs hatékonyságot (a vizsgálati anyag bélből való felszívódását, α) kell meghatározni. Ehhez a 7. függelékben található A7.1. egyenletet kell használni, amelyhez ismerni kell a következő adatokat: a származtatott koncentráció a halban a tisztulási fázis nulla időpillanatában, a (teljes) tisztulási sebességi állandó (k_2), koncentráció a tápban (C_{food}), a táplálékfelvételi sebességi állandó (I), továbbá a felvételi időszak tartama (t). Az ln (koncentráció) és a tisztulási idő közötti lineáris kapcsolat meredekségét és metszését mint teljes tisztulási sebességi állandót (k_2= meredekség) és a nulla időpillanati koncentrációt ($C_{0,d} = e^{intercept}$) kell rögzíteni, a fentiek szerint. A származtatott értékeket ellenőrizni kell a biológiai elfogadhatóság szempontjából (pl. az asszimilációs együttható mint tört, nem lehet nagyobb 1-nél). Az *(I)*-t a táp tömegének és az egyes napokon etetett halak tömegének hányadosaként kell megadni (ha az etetés a testtömeg 2 %-ának megfelelő arányban történik, az *(I)* 0,02 lesz). Ugyanakkor szükség lehet arra, hogy a számításhoz használt etetési arányt a halak növekedéséhez igazítsák (ez elvégezhető úgy, hogy az ismert növekedési sebességi állandó felhasználásával becslik a halaknak a felvételi fázis egyes időpillanataira jellemző tömegét; vö. 7. függelék). Amennyiben k_2-t és $C_{0,d}$-t nem lehet származtatni, például mivel a koncentrációk a második tisztulási mintában a meghatározási határ alatt vannak, elvégezhető a k_2 és a BMF_K „felső határának” konzervatív becslése (vö. 7. függelék).

Az asszimilációs hatékonyság (α) meghatározását követően a biomagnifikációs tényező kiszámítható úgy, hogy az α és a táplálékfelvételi sebességi állandó *(I)* szorzatát elosztják a (teljes) tisztulási sebességi állandóval (k_2). A növekedéssel korrigált biomagnifikációs tényezőt ugyanígy kell kiszámítani, de a növekedéssel korrigált tisztulási együtthatót kell használni (k_{2g}; vö. 162. és 163. pont). Az asszimilációs hatékonyság alternatív becslését akkor lehet származtatni, ha a felvételi fázis korai, lineáris szakaszában vett halmintán szövetanalízist végeztek; vö. 151. pont és 7. függelék. Ez az érték az asszimilációs hatékonyság független becslése egy lényegében expozícióval nem érintett szervezet esetében (azaz a halak a felvételi fázis elejéhez közel vannak). A tisztulási adatok alapján becsült asszimilációs hatékonyságot általában a BMF származtatására használják.

A lipidtartalomra és a növekedés okozta hígulásra tekintettel alkalmazott korrekció

A halak tisztulási fázisban bekövetkezett növekedése csökkentheti a halban mért vegyianyag-koncentrációt, ezáltal a teljes tisztulási sebességi állandó (k_2) magasabb lesz, mint ami csak a kiválasztási folyamatokból (pl. anyagcsere, kiürítés) eredne (vö. 72. pont). A vizsgálati halak lipidtartalma (amely nagymértékben összefügg a víztaszító anyagok bioakkumulációjával), valamint a táp lipidtartalma a gyakorlatban kellően változékony ahhoz, hogy korrekcióra legyen szükség annak érdekében, hogy a biomagnifikációs tényezőket hasznosan lehessen bemutatni. A biomagnifikációs tényezőt korrigálni kell a növekedés okozta hígulásra tekintettel (mint a kinetikus BCF-et a vízi expozíciós módszernél), továbbá korrigálni kell a tápnak a hal lipidtartalmához viszonyított lipidtartalma vonatkozásában (lipidkorrekciós tényező). Az e számításokkal kapcsolatos egyenletek és példák az 5., illetve a 7. függelékben találhatók.

A növekedés okozta hígulásra tekintettel történő korrekcióhoz ki kell számítani a növekedéssel korrigált tisztulási sebességi állandót (k_{2g}) (az egyenletek tekintetében lásd az 5. függeléket). Ezt a növekedéssel korrigált tisztulási sebességi

▼M7

állandót (k_{2g}) kell használni a növekedéssel korrigált biomagnifikációs tényező kiszámításához, mint a 73. pontban. Egyes esetekben ez a megközelítés nem alkalmazható. A növekedés okozta hígulásra tekintettel végzett korrekciót szükségtelenné tevő alternatív megközelítés a vizsgálati anyag halankénti (egész halra vetített) tömegét tükröző tisztulási adatokat alkalmazza, szemben a szokásos, a vizsgálati anyagnak a hal egységnyi tömegéhez viszonyított tömegére (koncentrációra) vonatkozó adatokkal. Ez könnyen elérhető adat, mivel az e vizsgálati módszer szerinti vizsgálatoknak a feljegyzett szöveti koncentrációkat az egyes halak tömegéhez kell kapcsolniuk. Az erre szolgáló egyszerű eljárást az 5. függelék ismerteti. Meg kell jegyezni, hogy a k_2-t akkor is becsülni kell és fel kell tüntetni a Vizsgálati jegyzőkönyvben, ha ezt az alternatív megközelítést alkalmazzák.

A hal és a táp lipidtartalmára tekintettel végzett korrekcióhoz, ha nem végeztek lipidanalízist valamennyi mintavételezett halon, a halban és a tápban lévő lipidfrakciók (w/w) átlagát származtatni kell ([1]). A lipidkorrekciós tényezőt (L_c) ezt követően úgy kell kiszámítani, hogy a halak lipidfrakciójának átlagát el kell osztani a táp lipidfrakciójának átlagával. A lipidtartalommal korrigált biomagnifikációs tényező kiszámításához a növekedéssel korrigált vagy adott esetben nem korrigált biomagnifikációs tényezőt el kell osztani a lipidkorrekciós tényezővel.

Ha a kémiai és a lipidanalízist ugyanazon a halon végezték el mindegyik mintavételi ponton, akkor az adott halra vonatkozó, egyedi, a lipidtartalom tekintetében korrigált szöveti adatokat kell felhasználni a lipidtartalom szempontjából korrigált BMF közvetlen kiszámításához (vö. (37)). A lipidtartalomra tekintettel korrigált koncentrációs adatok ábrája megmutatja a lipid alapú $C_{0,d}$-t és a k_2-t. Ekkor matematikai elemzést lehet végezni a 7. függelék ugyanazon egyenleteivel, de az asszimilációs hatékonyságot (a) a lipidtartalom tekintetében normalizált táplálékfelvételi sebességi állandó (I_{lipid}) és a lipidalapú étrendi koncentráció ($C_{food-lipid}$) felhasználásával kell kiszámítani. A lipiddel korrigált paramétereket ezt követően ugyanúgy felhasználják a BMF kiszámítására (meg kell jegyezni, hogy a növekedési sebességi állandóval való korrekciót a lipidfrakcióra kell alkalmazni és nem a hal nedves tömegére a lipidtartalommal és a növekedéssel korrigált BMF_{KgL} kiszámításához).

Az eredmények kiértékelése

A vizsgálati és a kontrollcsoportban megfigyelt átlagos növekedés elvben nem lehet nagymértékben különböző, hogy a toxikus hatások kizárhatók legyenek. A két csoport növekedési sebességi állandóit vagy növekedési görbéit megfelelő eljárással össze kell hasonlítani ([2])).

Vizsgálati jegyzőkönyv

A vizsgálat végeztével végleges jelentés készül, amely tartalmazza a vizsgálati anyaggal, a vizsgálati fajokkal és a vizsgálati körülményekkel kapcsolatos, a 81. pontban felsorolt információkat (mint a vízi expozíciós módszer esetében). Ezek mellett az alábbi információt kell megadni:

Vizsgálati anyag:

— a vizsgálati anyag stabilitása az elkészített tápban.

([1]) Ez a megközelítés az étrendi vizsgálat sajátossága, amely eltér a vízi expozíció esetén követett eljárástól, ezért ebben az esetben az egyértelműség érdekében a korrekció szó használatos a normalizáció helyett – lásd még a (106) bekezdéshez tartozó lábjegyzetet.

([2]) A növekedési sebességi állandókon *t*-próba végezhető annak vizsgálata érdekében, hogy a növekedés eltérő-e a kontroll- és a vizsgálati csoportok között, vagy *F*-próba végezhető a szóródás elemzése esetén. Szükség esetén F-próba vagy valószínűségi arány használható a megfelelő növekedési modell megválasztásához (54. OECD-monográfia, (32)).

▼M7

Vizsgálati körülmények:

— Az anyag névleges koncentrációja a tápban, tápkiegészítési technika, a tápkiegészítési eljárásban használt (lipid) vivőanyag mennyisége (ha alkalmaztak ilyet), a mért vizsgálatianyag-koncentráció a kiegészített tápban minden egyes analízis tekintetében (legalább három példányban a vizsgálat megkezdése előtt és a felvétel végén), valamint az átlagértékek.

— Ha alkalmaztak ilyet, a táp kiegészítéséhez használt olaj vagy oldószer hordozóanyag típusa és minősége (besorolás, beszállító stb.).

— Az alkalmazott táp típusa (a felépítésben részt vevő anyag elemzése ([1]), besorolás vagy minőség, beszállító stb.), az etetési arány a felvételi fázisban, a beadott táp mennyisége és gyakorisága (ideértve bármely kiigazítást a mintavételezett hal tömege alapján).

— A halak kémiai analízis céljából való begyűjtésének és leölésének időpontja minden mintavételi ponton (pl. egy órával a következő napi etetés előtt).

Eredmények:

— Minden elvégzett előzetes vizsgálat eredménye.

— Minden megfigyelt káros hatás leírása.

— A kémiai analízis valamennyi alkalmazott eljárásának leírása, ideértve az érzékelési határt és a meghatározási határt, a variabilitást és a visszanyerést.

— A tápban (kiegészített és kontrolltáp) mért lipidkoncentráció, egyedi és átlagértékek, valamint szórás.

— A hal tömegével (és hosszával) kapcsolatos adatok táblázatos formában, amelyeket összekapcsolnak a halegyedekkel mind a kontroll-, mind a kitett csoportban (például a mintába felvett egyes halakra egyedi azonosító alkalmazásával), és a számítások, a származtatott növekedési sebességi állandó(k) és 95 %-os konfidencia-intervallum(ok).

— A halban lévő vizsgálatianyag-koncentráció táblázatos formában, a mért átlagkoncentráció a felvétel végén ($C_{0,m}$), a származtatott (teljes) tisztulási sebességi állandó (k_2) és a halban lévő koncentráció a tisztulási fázis kezdetén ($C_{0,d}$), ezen értékek szóródásaival együtt (meredekség és metszés).

— A hal lipidtartalmával kapcsolatos adatok táblázatos formában (adott esetben a konkrét anyagkoncentrációkhoz hasonlítva), a vizsgálati csoportra és a kontrollcsoportra vonatkozó átlagértékek a vizsgálat kezdetén, a felvétel végén és a tisztulás végén.

— Görbék (ideértve valamennyi mért adatot), amelyek a következőket mutatják be (adott esetben a koncentrációt az állat egész testéhez vagy konkrét szöveteihez viszonyítva is ki lehet fejezni):

  — növekedés, (azaz a hal tömege és hossza az idő függvényében), vagy a természetes alapú logaritmussá alakított tömeg az idő függvényében;

([1]) A táp fehérje-, lipid-, nyersrost- és hamutartalom tekintetében történő analízisére szolgáló módszer; ez az információ általában a táp beszállítójától szerezhető be.

▼M7

— a vizsgálati anyag halban megfigyelt tisztulása; valamint

— természetes alapú logaritmussá alakított koncentráció (ln koncentráció) a tisztulási idő függvényében (ideértve a származtatott tisztulási sebességi állandót, k_2, és a halban a tisztulási fázis kezdetén jellemző, származtatott koncentráció természetes alapú logaritmusát $C_{0,d}$).

— Ha az ábra szemmel láthatóan egyértelmű kiugró értékeket mutat, statisztikailag érvényes kiugróérték-tesztet lehet alkalmazni a hamis adatpontok törlésére, valamint ezek mellőzését indokolni kell.

— Számított, növekedéssel korrigált tisztulási sebességi állandó és növekedéssel korrigált felezési idő.

— Számított asszimilációs hatékonyság (α).

— „Nyers” étrendi BMF, lipidtartalommal és növekedés okozta hígulásra tekintettel korrigált kinetikus BMF („nyers” és lipidtartalommal korrigált az egész hal nedves tömege alapján), szövetspecifikus BMF adott esetben.

— A radioaktív jelöléssel ellátott vizsgálati anyagok metabolitjaira és felhalmozódásukra vonatkozó információ.

— Bármi szokatlan dolog a vizsgálattal kapcsolatban, bármilyen eltérés ezektől az eljárásoktól, és bármely más vonatkozó információ.

— A releváns mért és számított adatok összefoglaló táblázata az alábbiakban látható:

Az anyag tisztulási sebességi állandói és biomagnifikációs tényezők (BMF_K)	
k_g (növekedési sebességi állandó; nap^{-1}):	Írja be az értéket (95 % KI) ([1])
k_2 (teljes tisztulási sebességi állandó; nap^{-1}):	Írja be az értéket (95 % KI)
k_{2g} (növekedéssel korrigált tisztulási sebességi állandó; nap^{-1}):	Írja be az értéket (95 % KI) ([1])
$C_{0,m}$ (mért nulla időpillanati koncentráció, koncentráció a halban a felvétel végén) (μg/g):	Írja be az értéket ± SD ([2])
$C_{0,d}$ (a tisztulási fázis származtatott nulla időpillanati koncentrációja) (μg/g):	Írja be az értéket ± SD ([2])
I (meghatározott táplálékfelvételi sebesség; g táp/g hal/nap):	Írja be az értéket
I_g (tényleges etetési arány, növekedés tekintetében kiigazítva; g táp/g hal/nap) ([2]):	Írja be az értéket ± SD ([2])
C_{food} (vegyianyag-koncentráció a tápban; μg/g):	Írja be az értéket ± SD ([2])
α (az anyag asszimilációs hatékonysága):	Írja be az értéket ± SD ([2])
BMF_K (kinetikus étrendi BMF):	Írja be az értéket (95 % KI) ([1])
BMF_{Kg} (növekedéssel korrigált kinetikus étrendi BMF):	Írja be az értéket (95 % KI) ([1])

▼M7

Az anyag tisztulási sebességi állandói és biomagnifikációs tényezők (BMF_K)	
$t_{1/2g}$ (növekedéssel korrigált felezési idő napokban):	Írja be az értéket ± SD ([2])
*L*c (lipidkorrekciós tényező):	Írja be az értéket
BMF_{KgL} (lipidtartalommal és növekedéssel korrigált kinetikus BMF):	Írja be az értéket
$BMF_{SS\text{-}L}$ (indikatív, lipidtartalommal korrigált állandósult állapoti BMF) ([2]):	Írja be az értéket ± SD ([2])

([1]) KI: konfidencia-intervallum (ha meg lehet becsülni)
([2]) SD: szórás (ha meg lehet becsülni)

SZAKIRODALOM

(1) E melléklet C.13., Bioakkumuláció halakban: Vízi vagy étrendi expozíció című fejezete.

(2) E melléklet A.6., Oldhatóság vízben című fejezete

(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) E melléklet A.8., *Megoszlási hányados (n-oktanol/víz): L*ombikrázásos módszer *című fejezete.*

(5) E melléklet A.24., *Megoszlási hányados (n-oktanol/víz), HPLC módszer című fejezete.*

(6) E melléklet A.23., *Megoszlási hányados (1-Oktanol/víz): Lassú keveréses módszer című fejezete.*

(7) E melléklet C.7., *Hidrolízis a ph függvényében című fejezete.*

(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) E melléklet A.5., *Felületi feszültség című fejezete.*

(10) E melléklet A.4., *Gőznyomás című fejezete.*

(11) E melléklet C.4., *A „gyors" biológiai lebonthatóság meghatározása című fejezete.*

(12) E melléklet C.29., *Gyors biológiai lebonthatóság: szén-dioxid-vizsgálat légmentesen zárt edényekben című fejezete*

(13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117-156.

(14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

▼M7

(16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35: 4097-4102.

(17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to commercially available pelletized fish food. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2058-2062.

(18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2′, 5,5′-tetrachlorobiphenyl. Toxicol. Sci. 77: 206-218.

(19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating in vivo fish bioaccumulation data. Integr. Environ. Assess. Manag. 4: 139-155.

(20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2436-2448.

(21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

(22) E melléklet C.47., A halak korai életszakaszára vonatkozó toxicitási vizsgálat *című fejezete*.

(23) E melléklet C.15., *Rövid távú toxicitási vizsgálat halembriókkal és hallárvákkal című fejezete*

(24) E melléklet C.14., *Halivadékok növekedési vizsgálata című fejezete*.

(25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.

(27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.

(28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA

(29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

(30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. Limnol. Oceanogr. 30: 1099-1105.

(31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst. 124: 1711-1718.

(32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

(33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

(34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.

(35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.

(37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Ã. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C_{12}- and C_{16}-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Environ. Toxicol. Chem. 15: 1775-1782.

(38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study – Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173-189.

(41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. Chemosphere. 14: 829-833.

(42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

(43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219-229.

(44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769-2777.

(46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined in vivo and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951-961.

(48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503-2517.

(49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

▼**M7**

(50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.

(51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I – Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II – Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Asszimilációs hatékonyság (α): a bélből a szervezetbe felszívódott anyag relatív mennyisége (az α-nak nincs mértékegysége, de gyakran százalékos arányban fejezik ki és nem törtként).

Bioakkumuláció: általában olyan folyamatként hivatkoznak rá, amelyben az anyag egy adott szervezetbeli koncentrációja olyan szintet ér el, amely meghaladja a légzés közegében (pl. a halak esetében a vízben, az emlősök esetében a levegőben), az étrendben vagy mindkettőben található koncentrációt (1).

A biokoncentráció a vizsgálati anyag koncentrációjának növekedése egy szervezetben/szervezeten (meghatározott szöveteiben/szövetein) a vizsgálati anyagnak a környező közegben lévő koncentrációjához viszonyítva.

A biokoncentrációs tényező (BCF, vagy K_B) az akkumulációs vizsgálat felvételi fázisának bármely időpontjában a vizsgálati anyag halban/halon, vagy meghatározott szöveteiben/szövetein lévő koncentrációjának (C_f, mg/g) és az anyag környező közegben lévő koncentrációjának (C_w, mg/l) a hányadosa. A BCF-et l kg^{-1}-ben kell kifejezni. Kérjük, tartsa szem előtt, hogy a növekedésre tekintettel történő korrekció és/vagy standard lipidtartalom itt nem jön figyelembe.

A biomagnifikáció a vizsgálati anyag koncentrációjának növekedése egy szervezetben/szervezeten (meghatározott szöveteiben/szövetein) a vizsgálati anyagnak a tápban lévő koncentrációjához viszonyítva.

A biomagnifikációs tényező (BMF) az anyag koncentrációja a ragadozóban a ragadozó zsákmányában (vagy táplálékában) található állandósult állapoti koncentrációhoz viszonyítva. Az e vizsgálati módszerben bemutatott módszerben a vizes fázisú expozíciót gondosan kerülik, így az e vizsgálati módszerből adódó BMF érték közvetlenül nem hasonlítható össze a terepvizsgálat során nyert BMF értékkel (ahol kombinálható a vízi és az étrendi expozíció).

Az étrendi biomagnifikációs tényező (étrendi BMF) az e vizsgálati módszerben az étrendi expozíciós vizsgálat eredményének leírására használt kifejezés, amely vizsgálatban a vizes fázisú expozíciót gondosan kerülik, így az e vizsgálati módszerből adódó BMF érték közvetlenül nem hasonlítható össze a terepvizsgálat során nyert BMF értékkel (ahol kombinálható a vízi és az étrendi expozíció).

A tisztulási vagy expozíció utáni (ürülési) fázis az az időtartam a vizsgálati halnak a vizsgálati anyagot tartalmazó közegből az anyagot nem tartalmazó közegbe történő áthelyezését követően, amelynek során az anyag vizsgálati halból (vagy meghatározott szövetéből) történő tisztulását (vagy nettó ürülését) figyelemmel kísérik.

A tisztulási (ürülési) sebességi állandó (k_2) a vizsgálati anyag koncentrációjának a vizsgálati halban (vagy meghatározott szöveteiben) való csökkenési sebességét definiáló numerikus érték, a vizsgálati halnak a vizsgálati anyagot tartalmazó közegből az anyagot nem tartalmazó közegbe való áthelyezését követően (a k_2-t nap^{-1}-ben fejezik ki).

Oldott szerves szén (DOC) a vizsgálati közegekben található oldott szerves forrásokból eredő szénkoncentráció mértéke.

Az expozíciós vagy felvételi fázis az az időtartam, amíg a hal érintkezik a vizsgálati anyaggal.

A táplálékfelvételi sebesség *(I)* az egyes halak által naponta elfogyasztott táp átlagos mennyisége a halak becsült átlagos teljes testtömegéhez viszonyítva (g táp/g hal/napban kifejezve).

▼M7

A kinetikus biokoncentrációs tényező (BCF_K) a felvételi sebességi állandó (k_1) tisztulási sebességi állandóhoz (k_2) viszonyított aránya (azaz k_1/k_2 – a megfelelő meghatározásokat lásd ebben a függelékben). Elvben ennek az értéknek összehasonlíthatónak kellene lennie a BCF_{SS}-szel (a meghatározást lásd fent), de eltérések fordulhatnak elő, ha az állandósult állapot bizonytalan volt, vagy ha a kinetikus BCF-et növekedéssel korrigálták.

A lipidtartalom tekintetében normalizált kinetikus biokoncentrációs tényező (BCF_{KL}) az 5 %-os lipidtartalmú hal tekintetében normalizált tényező.

A lipidtartalom tekintetében normalizált, növekedéssel korrigált kinetikus biokoncentrációs tényező (BCF_{KgL}) a vizsgálat során az 5 %-os lipidtartalmú hal tekintetében normalizált, növekedéssel korrigált tényező, az 5. függelékben leírtak szerint.

A lipidtartalom tekintetében normalizált állandósult állapoti biokoncentrációs tényező (BCF_{SSL}) az 5 %-os lipidtartalmú hal tekintetében normalizált tényező.

Több összetevőből álló anyag a REACH alkalmazásában olyan anyag, amelyben egynél több fő alkotóelem van jelen 10–80 % (w/w) koncentrációban.

Az oktanol-víz megoszlási együttható (K_{OW}) az anyag n-oktanolban és vízben, egyensúlyban mért oldhatóságának aránya (A.8. (2), A.24. (3), A.23. (4)módszer); P_{OW}-vel is jelölik. Az anyag vízi szervezetekbeli biokoncentrációs potenciálja jelzésére a K_{OW} logaritmusát használják.

Szemcsés szerves szén (POC) a vizsgálati közegekben található szuszpendált szerves forrásokból eredő szénkoncentráció mértéke.

Szilárd fázisú mikroextrakció (SPME) oldószermentes analitikai módszer, amelyet a hígítási rendszerekhez fejlesztettek ki. E módszer keretében a polimerrel bevont rostot a vizsgálandó analitot tartalmazó gáz- vagy folyadékfázisnak teszik ki. Általában egy minimális analitikai időt írnak elő, hogy a szilárd és folyékony fázisok között egyensúly alakuljon ki, tekintettel a mérendő fajokra. Ezt követően a vizsgálandó analit koncentrációja a meghatározási módszertől függően meghatározható közvetlenül a rostból, vagy miután azt a rostból egy oldószerbe kivonták.

Állandósult állapot látható a halban található vizsgálati anyag (C_f) időfüggő ábráján, amikor a görbe párhuzamos az időtengellyel, és a C_f három egymást követő, legalább két nap különbséggel vett mintán alapuló elemzése ± 20 %-on belül van egymáshoz képest, és a C_f jelentős időbeli növekedése nem tapasztalható az első és az utolsó sorozatos elemzés között. Összevont minták analízisénél legalább négy egymást követő analízis szükséges. Olyan vizsgálati anyagoknál, amelyek felvétele lassú, megfelelőbbek a hétnapos időközök.

Az állandósult állapoti biokoncentrációs tényező (BCF_{SS}) nem változik jelentősen egy hosszabb időtartam során, amely alatt a vizsgálati anyag koncentrációja állandó a környező közegben (vö. az állandósult állapot meghatározásával).

Teljes szervesszén-tartalom (TOC) a vizsgálati közegben található valamennyi szerves forrásból, ideértve a szemcsés és az oldott forrásokat, eredő szénkoncentráció mértéke.

A felvételi sebességi állandó (k_1) a vizsgálati anyag – halban/halon (vagy meghatározott szöveteiben/szövetein) lévő – koncentrációjának az expozíciós idő alatti növekedési sebességét definiáló numerikus érték (a k_1-et $l\ kg^{-1}\ nap^{-1}$-ben fejezik ki).

Az ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok UVCB-ként ismertek.

▼**M7**

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Vizsgálati vegyi anyag: e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

SZAKIRODALOM

(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. Mol. Assess. Manag. 5: 624-637.

(2) E melléklet A.8. fejezete: *Megoszlási együttható (n-oktanol/víz) Lombikrázásos módszer*

(3) E melléklet A.24. fejezete: *Megoszlási együttható (n-oktanol/víz), HPLC módszer*

(4) E melléket A.23. fejezete: *Megoszlási együttható (1-oktanol/víz) Lassú keveréses módszer*.

▼M7

2. függelék

AZ ELFOGADHATÓ MINŐSÉGŰ HÍGÍTÓVÍZ NÉHÁNY FONTOSABB KÉMIAI TULAJDONSÁGA

Összetevő	Határkoncentráció
Finomszemcsés anyag	5 mg/l
Összes szerves szén	2 mg/l
Nem ionizált ammónia	1 µg/l
Maradék klór	10 µg/l
Szerves foszfort tartalmazó peszticidek	50 ng/l
Szerves klórtartalmú peszticidek + poliklórozott bifenilek összesen	50 ng/l
Összes szerves klór	25 ng/l
Alumínium	1 µg/l
Arzén	1 µg/l
Króm	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Réz	1 µg/l
Vas	1 µg/l
Ólom	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Cink	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Higany	100 ng/l
Ezüst	100 ng/l

▼M7

3. függelék

VIZSGÁLATHOZ AJÁNLOTT HALFAJOK

Ajánlott fajok	Ajánlott vizsgálatihő-mérséklet-tartomány (°C)	Vizsgálati állat ajánlott teljes hossza (cm) (2)
Danio rerio (1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebradánió	20 – 25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Amerikai cselle	20 – 25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Ponty	20 – 25	8,0 – 4,0 (3)
Oryzias latipes (Teleostei, Poecilliidae) (Temminck and Schlegel) Japán rizshal	20 – 25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poecilliidae) (Peters) Szivárványos guppi	20 – 25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) Kékkopoltyús naphal	20 – 25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Szivárványos pisztráng	13 – 17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Tüskés pikó	18 – 20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer *et al.* (1)

(2) Meg kell jegyezni, hogy magában a vizsgálatban a méret és a növekedési sebességi állandók származékainak megállapításához szükséges előnyben részesített mérték a tömeg. Elismert ugyanakkor, hogy a hossz praktikusabb, ha a halakat látvány alapján kell kiválasztani a kísérlet elején (azaz a törzsállományból).

(3) Ezt a hossztartományt az új vegyi anyagok stb. japán vegyianyag-ellenőrzési törvényen alapuló vizsgálati módszerei tüntetik fel.

Különböző torkolati és tengeri fajok kevésbé széles körben használtak, például:

Pettyes árnyékhal (*Leiostomus xanthurus*)

Tarka fogasponty (*Cyprinodon variegatus*)

Atlanti ezüstösoldalú hal (*Menidia beryllina*)

Shiner perch (*Cymatogaster aggregata*)

English sole (*Parophrys vetulus*)

Staghorn sculpin (*Leptocottus armatus*)

Tüskés pikó (*Gasterosteus aculeatus*)

Farkassügér (*Dicentracus labrax*)

Szélhajtó küsz (*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

A táblázatban felsorolt édesvízi halak könnyen tenyészthetők, és/vagy könnyen beszerezhetők egész évben, míg a tengeri és torkolati fajok beszerezhetősége részben bizonyos országokra korlátozódik. A fent felsorolt halfajok halastóban vagy laboratóriumban is (betegségek és paraziták szempontjából ellenőrzött körülmények között) tenyészthetők, így a vizsgálati állatok egészségesek lesznek és származásuk ismert lesz. Ezek a halak a világ sok részében beszerezhetők.

SZAKIRODALOM

(1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.

▼M7

4. függelék

MINTAVÉTELI ÜTEMTERVEK A VÍZI ÉS AZ ÉTRENDI EXPOZÍCIÓS VIZSGÁLATHOZ

1. **Elméleti példa teljes vízi expozíciós biokoncentrációs vizsgálat mintavételi ütemtervére log K_{OW} = 4 anyagok esetében**

Halak mintavételezése	Mintavétel ütemezése		Vízminták száma (1)	Halak száma mintánként (1)
	Minimálisan megkövetelt gyakoriság (nap) (2)	További mintavétel (nap) (2)		
Felvételi fázis				
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))
Tisztulási fázis				Halak áthelyezése vizsgálati vegyi anyagtól mentes vízbe
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))
ÖSSZESEN				40 – 72 (48 – 80) (5)

(1) A zárójeles értékek a minták (víz, hal) számát jelentik, amennyiben járulékos mintavételezés történik.

(2) A k_2 vizsgálat előtti becslése log K_{OW} = 4,0 esetén 0,652 nap^{-1}. A kísérlet teljes időtartama 3 × t_{SS} = 3 × 4,6 nap, azaz 14 nap. A t_{SS} becslését lásd az 5. függelékben.

(3) Vízminta minimum három teljestérfogat-csere után lett véve.

(4) A halmintát a törzsállományból vették.

(5) Ha nagyobb pontosság vagy anyagcsere-vizsgálatok szükségesek, amely esetben több hal kell, ezeket különösen a felvételi fázis és a tisztulási fázis végén kell mintavételezni (vö. 40. pont).

(6) A lipidtartalom analíziséhez legalább 3 további halra van szükség, ha nem lehet ugyanazt a halat használni, mint amelyiket a vizsgálati anyag koncentrációjának meghatározására vettek mintába a vizsgálat kezdetén, a felvételi fázis végén, illetve a tisztulási fázis végén. Figyelembe kell venni, hogy sok esetben lehetséges a 3 kontrollhal kizárólagos használata (vö. 56. pont).

▼M7

2. **Elméleti példa az anyag étrendi bioakkumulációs vizsgálatának mintavételezési ütemtervére 10 napos felvételi és 42 napos tisztulási fázist követve**

Mintavételi alkalmak	Mintavétel ütemezése		Tápminták száma	Halak száma mintánként	
	A fázis napja	További halminták?		Vizsgálati csoport	Kontrollcsoport
Felvételi fázis					
1	0	Lehetséges (1) (2)	3 – vizsgálati csoport	0	5 – 10
			3 – kontrollcsoport (1)		(8 – 13) (2)
1A (3)	1–3			5 – 10	5 – 10
2	10	Igen (4)	3 – vizsgálati csoport	10 – 15 (4)	5 – 10
			3 – kontrollcsoport (1)	(13 – 18) (5)	(8 – 13) (5)
Tisztulási fázis					
3	1	Igen (4)		10 – 15 (4)	5 – 10
4	2			5 – 10	5 – 10
5	4			5 – 10	5 – 10
6	7	Igen (4)		10 – 15 (4)	5 – 10
7	14			5 – 10	5 – 10
8	28			5 – 10	5 – 10
9	42	Igen (4)		10 – 15 (4) (13 – 18) (5)	5 – 10 (8 – 13) (5)
ÖSSZESEN				59 – 120 (63 – 126) (4) (5)	50 – 110 (56 – 116) (4) (5)

(1) 3 tápmintát analizálnak mind a kontroll-, mind a vizsgálati csoport esetében, a vizsgálati anyag koncentrációi és a lipidtartalom tekintetében.

(2) A halmintát a törzsállományból veszik a vizsgálat kezdetéhez a lehető legközelebbi időpontban; a lipidtartalom tekintetében legalább 3 halat kell mintába venni a törzsállományból a vizsgálat kezdetén.

(3) A felvételi fázis korai szakaszában történő (opcionális) mintavétel olyan adatokat szolgáltat a vizsgálati anyag étrendi asszimilációjának számításához, amelyek összehasonlíthatók a tisztulási fázis adataiból számított asszimilációs hatékonysággal.

(4) 5 további hal vehető mintába a szövetspecifikus analízishez.

(5) A lipidtartalom analíziséhez legalább 3 további halra van szükség, ha nem lehet ugyanazt a halat használni, mint amelyiket a vizsgálati anyag koncentrációinak meghatározására vettek mintába a vizsgálat kezdetén, a felvételi fázis végén, illetve a tisztulási fázis végén. Figyelembe kell venni, hogy sok esetben lehetséges a 3 kontrollhal kizárólagos használata (vö. 56. és 153. pont).

A fázis és a mintavétel ütemezésével kapcsolatos észrevétel: a felvételi fázis a kiegészített táppal való első etetéskor kezdődik. Egy kísérleti nap az etetés időpontjától röviddel a 24 órával későbbi következő etetés időpontja előttig tart. Az első mintavételre (a táblázatban 1) röviddel (pl. egy órával) az első etetés előtt kell sort keríteni. A vizsgálat során a mintavételt ideális esetben röviddel a következő napi etetés előtt kell elvégezni (azaz körülbelül a mintavételi napon végrehajtott etetést követően 23 órával). A felvételi fázis röviddel azelőtt ér véget, hogy az első kiegészítetlen tápot beadnák, amikor a tisztulási fázis kezdődik (a vizsgálati csoportba tartozó halak valószínűleg még emésztik a kiegészített tápot a kiegészített táppal való utolsó etetést követő 24 órában). Ez azt jelenti, hogy a felvételi fázis végi mintát röviddel a kiegészítetlen táppal való első etetés előtt kell venni, a tisztulási fázis első mintáját pedig a kiegészítetlen táppal való első etetést követő körülbelül 23 órával.

▼M7

5. függelék

ÁLTALÁNOS SZÁMÍTÁSOK

1. Bevezetés

2. A felvételi fázis időtartamának előrejelzése

3. A tisztulási fázis időtartamának előrejelzése

4. Lépcsőzetes módszer a k2 tisztulási (ürülési) sebességi állandó meghatározására

5. Lépcsőzetes módszer a k1 felvételi sebességi állandó meghatározására (csak vízi expozíciós módszer esetén)

6. Egyidejű módszer a felvételi és a tisztulási (ürülési) sebességi állandó számítására (csak vízi expozíciós módszer esetén)

7. A növekedés okozta hígulásra tekintettel alkalmazott korrekció kinetikus BCF és BMF esetén

8. Az 5 %-os lipidtartalomra történő lipidnormalizáció (csak vízi expozíciós módszer esetén)

1. BEVEZETÉS

Az általános vízi bioakkumulációs halvizsgálati modell a felvételi és ürülési folyamatokkal írható le, figyelmen kívül hagyva a tápon keresztül történő felvételt. A halban lévő koncentráció változási sebességét ($mg \cdot kg^{-1} \cdot nap^{-1}$) leíró differenciál egyenlet (dC_f/dt) a következő (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[A5.1. egyenlet]}$$

ahol:

k_1 = A hal általi felvétel elsőrendű sebességi állandója ($l \cdot kg^{-1} \cdot nap^{-1}$).

k_2 = A halból való tisztulás elsőrendű sebességi állandója (nap^{-1}).

k_g = A halnövekedés elsőrendű sebességi állandója („növekedés okozta hígulás”) (nap^{-1}).

k_m = A metabolikus átalakulás elsőrendű sebességi állandója (nap^{-1}).

k_e = A fekália ürítésének elsőrendű sebességi állandója (nap^{-1}).

C_w = Koncentráció a vízben ($mg \cdot l^{-1}$).

C_f = Koncentráció a halban ($mg \cdot kg^{-1}$ nedves tömeg).

A biológiailag felhalmozódó anyagok esetében várható, hogy az idővel súlyozott átlag (TWA) a leginkább releváns expozíciós koncentráció a vízben (C_w) a megengedett ingadozási tartományon belül (vö. 24. pont). A vízbeli koncentráció idővel súlyozott átlagát ajánlott a C.20. vizsgálati módszer 6. függelékében található eljárás szerint kiszámítani (2). Meg kell jegyezni, hogy a vízi koncentráció ln-transzformációja akkor megfelelő, ha exponenciális bomlás várható a megújítási időszakok között, pl. félstatikus vizsgálati terv esetén. Átfolyásos rendszerben nincs szükség az expozíciós koncentrációk ln-transzformációjára. Ha származtatják a vízi koncentráció idővel súlyozott átlagát, azt fel kell tüntetni a Vizsgálati jegyzőkönyvben, és fel kell használni a későbbi számítások során.

A BCF-re irányuló standard halvizsgálatban a felvétel és a tisztulás leírható két elsőrendű kinetikai folyamattal.

▼M7

Felvételi sebesség = $k_1 \times C_w$ [A5.2. egyenlet]

Összes tisztulási arány = $(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$ [A5.3. egyenlet]

Állandósult állapotban, feltételezve, hogy a növekedés és az anyagcsere elhanyagolható (azaz a k_g és k_m értékek nem különböztethetők meg a nullától), a felvételi sebesség megegyezik a tisztulási sebességgel, így az A5.2. egyenlet és az A5.3. egyenlet kombinálásából a következő összefüggés adódik:

$$BCF = \frac{C_{f\ -SS}}{C_{w\ -SS}} = \frac{k_1}{k_2}$$ [A5.4. egyenlet]

ahol:

$C_{f\text{-}SS}$ = Állandósult állapoti koncentráció a halban (mg·kg^{-1} nedves tömeg).

$C_{w\text{-}SS}$ = Állandósult állapoti koncentráció a vízben (mg l^{-1}).

A k_1/k_2 hányadosa kinetikus BCF-ként (BCF_K) ismert, és annak meg kell egyeznie az állandósult állapoti BCF-fel (BCF_{SS}), amely a halban lévő állandósult állapoti koncentráció és a vízben lévő ilyen koncentráció hányadosából adódik, de eltérések fordulhatnak elő, ha az állandósult állapot bizonytalan volt, vagy ha a kinetikus BCF-et növekedéssel korrigálták. Ugyanakkor, mivel a k_1 és k_2 állandók, az állandósult állapotot nem feltétlenül kell elérni a BCF_K származtatásához.

Ez az 5. függelék ezen elsőrendű egyenletek alapján általános számításokat tartalmaz, amelyek mind a vízi, mind az étrendi expozíciós bioakkumulációs módszerekhez szükségesek. Az 5. 6. és 8. szakasz ugyanakkor csak a vízi expozíciós módszer tekintetében releváns, ám itt „általános” módszerként szerepel. A lépcsőzetes (4. és 5. szakasz) és szimultán (6. szakasz) modellek lehetővé teszik a kinetikus BCF-ek származtatásához használt felvételi és tisztulási állandók kiszámítását. A k_2 meghatározásának lépcsőzetes módszere (4. szakasz) fontos az étrendi módszer esetében, mivel mind az asszimilációs hatékonyság, mind a BMF kiszámításához nélkülözhetetlen. Az étrendi módszerre sajátosan jellemző számításokat a 7. függelék mutatja be.

2. A FELVÉTELI FÁZIS IDŐTARTAMÁNAK ELŐREJELZÉSE

A vizsgálat elvégzése előtt a k_2, és így az állandósult állapot eléréséhez szükséges idő adott százaléka megbecsülhető a k_2 és az *n*-oktanol/víz megoszlási együttható (K_{OW}) vagy a k_1 és a BCF tapasztalati összefüggéséből. Fontos megjegyezni azonban, hogy az e szakaszban bemutatott egyenletek csak akkor alkalmazhatók, ha a felvétel és a tisztulás elsőrendű kinetikát követ. Ha egyértelműen nem ez a helyzet, ajánlott biostatisztikustól és/vagy farmakokinetikustól szakvéleményt kérni, amennyiben a felvételi fázissal kapcsolatos előrejelezésekre van szükség.

A k_2 (nap^{-1}) becslése több módszerrel is végezhető. Például elsőként az alábbi tapasztalati összefüggéseket lehet felhasználni ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{OW}$ (r^2=0,95) [(3); A5.5. egyenlet]

vagy

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF}$$ [A5.6. egyenlet]

Ahol $k_1 = 520 \times W^{-0,32}$ (a log $K_{OW} > 3$ anyagok esetében) ($r^2 = 0{,}85$) [(4); A5.7. egyenlet]

([1]) Mint minden tapasztalati összefüggés esetében, itt is meg kell győződni arról, hogy a vizsgálati anyag az összefüggés alkalmazási körébe tartozik-e.

▼M7

és$BCF = 10^{(0{,}910 \cdot logK_{OW} - 1{,}975 \cdot log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)}$ (r^2 = 0,90) [(5); A5.8. egyenlet]

W = a kezelt halak tömegének átlaga (nedves tömeg grammja) a felvétel végén/tisztulás kezdetén ([1])

Egyéb összefüggéseket lásd a (6) hivatkozásban. Előnyös lehet összetettebb modellek alkalmazása a k_2 becslése során, ha például valószínűsíthető, hogy jelentős anyagcserére kerülhet sor (7) (8). Ugyanakkor, minél bonyolultabb az adott modell, annál nagyobb körültekintést kell tanúsítani az előrejelzések értelmezésénél. A nitrocsoportok jelenléte például gyors anyagcserére utalhat, de nem mindig ez a helyzet. Ezért a felhasználónak mindig össze kell vetnie az előrejelzési módszer eredményeit a kémiai szerkezettel és bármely más releváns információval (például előzetes vizsgálatokkal) a vizsgálat ütemtervének meghatározásakor.

A k_2-becslés felhasználásával, a felvételt és tisztulást leíró általános kinetikai egyenletből (elsőrendű kinetika) kiszámítható az állandósult állapot bizonyos százalékának eléréséhez szükséges idő, feltételezve, hogy a növekedés és az anyagcsere elhanyagolható. Ha a vizsgálat során jelentős növekedés tapasztalható, az alább leírt becslések nem megbízhatók. Ilyen esetekben jobb a növekedéssel korrigált k_{2g} alkalmazása, amint az később bemutatásra kerül (lásd e függelék 7. szakaszát):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \qquad \text{[A5.9. egyenlet]}$$

vagy ha C_w állandó:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[A5.10. egyenlet]}$$

Az állandósult állapot közelítésekor ($t \to \infty$) az A5.10. egyenlet egyszerűsíthető (*vö.* (9) (10)):

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \qquad \text{[A5.11. egyenlet]}$$

vagy

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \qquad \text{[A5.12. egyenlet]}$$

Ekkor a BCF × C_w a halakban mérhető koncentráció közelítése „állandósult állapotban” ($C_{f\text{-}SS}$). [Megjegyzés: ugyanez a megközelítés alkalmazható az állandósult állapoti BMF becslésére az étrendi vizsgálatnál. Ebben az esetben a BCF helyébe a BMF, a C_w helyébe a C_{food}, azaz a tápban lévő koncentráció lép a fenti egyenletekben]

Az A5.10. egyenlet átírható:

$$C_f = C_{f\ -SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[A5.13. egyenlet]}$$

vagy

$$\frac{C_f}{C_{f\ -SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[A5.14. egyenlet]}$$

Az A5.14. egyenlet alkalmazásával megjósolható az állandósult állapot bizonyos százalékának eléréséhez szükséges idő, amennyiben az A5.5. vagy A5.6. egyenlet felhasználásával a k_2-t előzetesen megbecsülték.

Iránymutatásként: statisztikailag elfogadható adatok (BCF_K) előállításához a felvételi fázis statisztikailag optimális időtartama az a periódus, ami ahhoz szükséges, hogy a halban lévő vizsgálatianyag-koncentráció logaritmusának

([1]) A halak felvételi fázis végén jellemző tömegét korábbi vizsgálati adatokból, vagy a vizsgálati faj vizsgálat kezdetére jellemző szokásos tömegéből kiinduló, egy tipikus (pl. 28 napos) felvételi fázis során valószínűsíthető méretnövekedésével kapcsolatos ismeretek alapján lehet megbecsülni.

▼M7

görbéje lineáris időskálán ábrázolva elérje az állandósult állapot 50 %-át (azaz $0{,}69/k_2$), de ne legyen nagyobb az állandósult állapot 95 %-ánál (azaz $3{,}0/k_2$-nél)(11). Amennyiben a felhalmozódás túllép az állandósult állapot 95 %-án, el lehet végezni a BCF_{SS} kiszámítását.

Az állandósult állapot 80 %-ának eléréséhez szükséges idő (az A5.14. egyenlet felhasználásával):

$$0{,}80 = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[A5.15. egyenlet]}$$

vagy

$$t_{80} = \frac{-\ln(0{,}20)}{k_2} = \frac{1{,}6}{k_2} \qquad \text{[A5.16. egyenlet]}$$

Ugyanígy az állandósult állapot 95 %-ának eléréséhez szükséges idő:

$$t_{95} = \frac{-ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2} \qquad \text{[A5.17. egyenlet]}$$

Például log Kow = 4 értékkel jellemzett vizsgálati anyag esetében a felvételi fázis időtartama (azaz az állandósult állapot bizonyos százalékának eléréséhez szükséges idő, pl. t_{80} vagy t_{95}) (az A5.5., A5.16. és A5.17. egyenletet használva):

$$log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0{,}652 \text{ nap}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1{,}6}{0{,}652} = 2{,}45 \; nap(59 \; óra)$$

$$\text{vagy } t_{95} = \frac{3{,}0}{0{,}652} = 4{,}60 \; nap(110 \; óra)$$

Ezenkívül:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55{,}31 \; (óra) \qquad \text{[A5.18. egyenlet]}$$

kifejezés használható az effektív állandósult állapot eléréséhez szükséges idő (t_{eSS}) kiszámításához (12). Amelynek eredménye a log K_{OW} = 4 értékkel jellemzett anyagok esetében:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55{,}31 = 121 \; óra$$

3. A TISZTULÁSI FÁZIS IDŐTARTAMÁNAK ELŐREJELZÉSE

A test anyagterhelésének a kezdeti koncentráció bizonyos százalékára való csökkentéséhez szükséges idő megbecsülhető a felvételt és tisztulást leíró általános egyenletből (elsőrendű kinetikát feltételezve, vö. A5.9. egyenlet) (1) (13).

A tisztulási fázisban C_w (vagy az étrendi vizsgálat esetén C_{food}) nullának feltételezett. Az egyenlet ezt követően egyszerűsíthető:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \qquad \text{[A5.19. egyenlet]}$$

vagy

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \qquad \text{[A5.20. egyenlet]}$$

ahol $C_{f,0}$ a koncentráció a tisztulási fázis kezdetén.

Az 50 %-os tisztulás aztán t_{50} időpontban következik be:

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

vagy

$$t_{50} = \frac{-\ln(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Hasonlóan, a 95 %-os tisztulás elérésének időpontja:

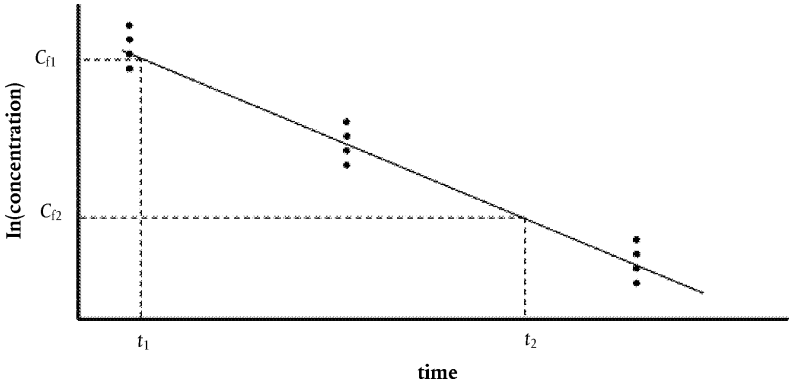
$$t_{95} = \frac{-\ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Amennyiben 80 %-os felvételt használnak az első periódusban ($1{,}6/k_2$), és 95 %-os ürülést a tisztulási fázisban ($3{,}0/k_2$), akkor a tisztulási fázis megközelítőleg kétszer hosszabb a felvételi fázisnál.

Meg kell jegyezni, hogy a becslések azon a feltevésen alapulnak, hogy a felvételi és tisztulási mintázat elsőrendű kinetikát követ. Amennyiben nyilvánvalóan nem elsőrendű a kinetika, ezek a becslések nem érvényesek.

4. LÉPCSŐZETES MÓDSZER A K_2 TISZTULÁSI (ÜRÜLÉSI) SEBESSÉGI ÁLLANDÓ MEGHATÁROZÁSÁRA

A legtöbb biokoncentrációs adatról feltételezett, hogy „ésszerűen” jól leírható egy egyszerű kétváltozós modellel, amely a tisztulási fázisban (természetes alapú logaritmusos skálán) a halakban lévő koncentrációk pontjaira illeszthető egyenest ad.



Meg kell jegyezni, hogy az egyenes vonaltól való eltérések elsőrendűnél összetettebb tisztulási mintázatot jelezhetnek. Az elsőrendű kinetikától eltérő tisztulási típusok meghatározására a grafikus módszer alkalmazható.

A k_2 több (mintavételi) időpont esetén történő kiszámítására az ln (koncentráció) lineáris regresszióját kell elvégezni az idő függvényében. A regressziós egyenes meredeksége adja a tisztulási sebességi állandó, k_2 becslését ([1]). A metszésből könnyen (hibahatárokra is figyelemmel) kiszámítható a halban lévő átlagos koncentráció a tisztulási fázis kezdetén ($C_{0,d}$; amely megfelel a halban a felvételi fázis végén lévő átlagos koncentrációnak) ([1]):

([1]) A lineáris regressziót lehetővé tevő legtöbb programban megadják a becslések standard hibáit és konfidencia-intervallumait is, pl. a Microsoft Excelben az adatelemzési eszközcsomag használatával.

▼M7

$$C_{0,\ d} = e^{intercept} \qquad \text{[A5.21. egyenlet]}$$

A k_2 kiszámítása, ha csak két (mintavételi) időpont áll rendelkezésre (mint a minimalizált terv esetén), a két átlagkoncentrációt a következő egyenlet váltja fel:

$$k_2 = \frac{\ln\ (C_{fl}) - \ln\ (C_{f2})}{t_{\ 2} - t_1} \qquad \text{[A5.22. egyenlet]}$$

Ahol $\ln(C_{f1})$ és $\ln(C_{f2})$ a t_1, illetve t_2, időre jellemző koncentráció természetes alapú logaritmusa, továbbá t_2 és t_1 a két minta begyűjtésének ideje a tisztulási fázis kezdetéhez viszonyítva ([1]).

5. LÉPCSŐZETES MÓDSZER A K_1 FELVÉTELI SEBESSÉGI ÁLLANDÓ MEGHATÁROZÁSÁRA (CSAK VÍZI EXPOZÍCIÓS MÓDSZER ESETÉN)

A k_1 értékének a felvételi fázisra jellemző, egymást követő időpontok koncentrációs adataira tekintettel történő meghatározásához a következő modellhez illeszkedő számítógépes programot kell használni:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{\ -k_2 t}) \qquad \text{[A5.23. egyenlet]}$$

Ahol a k_2 az előző számításból adódik, $C_f\ (t)$ és $C_w\ (t)$ pedig a halban és a vízben lévő koncentráció t időben.

A k_1 kiszámítására, ha csak két (mintavételi) időpont áll rendelkezésre (mint a minimalizált terv esetén), a következő képletet kell használni:

$$k_1 = \frac{C_{\ f} \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{[A5.24. egyenlet]}$$

Ahol a k_2 a korábbi számításból adódik, C_f a halban lévő koncentráció a tisztulási fázis kezdetén, C_w pedig a vízben lévő átlagkoncentráció a felvételi fázisban ([2]).

A megfelelő illeszkedés értékeléséhez alkalmazható a k_1 és k_2 mért, mintavételezett pontadatokhoz viszonyítva ábrázolt meredekségének vizuális megfigyelése. Ha az derül ki, hogy a lépcsőzetes módszer gyenge becslést ad a k_1-re, akkor a k_1 és a k_2 kiszámítására az egyidejű megközelítést kell alkalmazni (lásd a következő 6. szakaszt). Az eredményül adódó meredekséget össze kell vetni az ábrázolt mért adatokkal a megfelelő illeszkedés vizuális vizsgálatának céljából. Ha az illeszkedés továbbra sem megfelelő, az arra utalhat, hogy nem elsőrendű kinetikáról van szó, és összetettebb modelleket kell alkalmazni.

6. EGYIDEJŰ MÓDSZER A FELVÉTELI ÉS A TISZTULÁSI (ÜRÜLÉSI) SEBESSÉGI ÁLLANDÓ SZÁMÍTÁSÁRA (CSAK VÍZI EXPOZÍCIÓS MÓDSZER ESETÉN)

Számítógépes programok használhatók a k_1 és k_2 értékének az egymást követő időpontok koncentrációs adataiból és az alábbi modell alapján történő kiszámítására

$$C_f = C_{\ w} \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{\ -k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[A5.25. egyenlet]}$$

$$C_f = C_{\ w} \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{\ -k_2(t\ -\ t_c)} - e^{\ -k_2 t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[A5.26. egyenlet]}$$

ahol:

t_c = a felvételi fázis végének időpontja.

Ez a megközelítés közvetlenül megadja a k_1 és k_2 becsléseinek standard hibáit. Ha a k_1/k_2 helyébe a BCF lép (*vö.* A5.4. egyenlet) az A5.25 A5.26.

([1]) A lineáris regressziós módszerrel szemben e képlet alkalmazása nem ad standard hibát a k2 vonatkozásában.

([2]) A lineáris illesztési eljárással szemben e módszer általában nem ad standard hibát vagy konfidencia-intervallumot a becsült k1 vonatkozásában.

▼M7

egyenletben, a BCF standard hibáját és a 95 %-os konfidencia-intervallumot is meg lehet becsülni. Ez kifejezetten hasznos, ha különböző becsléseket kell összehasonlítani adattranszformáció következtében. A függő változó (a halban lévő koncentráció) ln-transzformációval vagy anélkül is illeszthető, és értékelhető az eredményül adódó BCF bizonytalansága.

Mivel egyidejű becslés esetén erőteljes korreláció állapítható meg a k_1 és k_2 paraméterek között, tanácsos lehet először csak a tisztulási adatokból kiszámolni a k_2-t (lásd fent); a k_2 a legtöbb esetben a tisztulási görbéből viszonylag nagy pontossággal megbecsülhető. Ezt követően nem lineáris regresszióval ki lehet számolni k_1-et a felvételi adatokból ([1]). A lépcsőzetes illesztéskor tanácsos ugyanazt az adattranszformációt alkalmazni.

A megfelelő illeszkedés értékeléséhez alkalmazható az eredményül adódó, a mintavételezett pontadatokhoz viszonyítva ábrázolt meredekségek vizuális megfigyelése. Ha az derül ki, hogy ez a módszer gyenge becslést ad a k_1-re, akkor a k_1 és a k_2 kiszámítására az egyidejű megközelítést kell alkalmazni. Az illesztett modellt itt is össze kell vetni az ábrázolt mért adatokkal a megfelelő illeszkedés vizuális vizsgálatának céljából; és az egyes illesztési típusoknál az eredményül adódó paraméterbecsléseket össze kell vetni a k_1 és k_2 tekintetében, az eredményül adódó BCF-et, standard hibáikat és/vagy konfidencia-intervallumaikat.

Ha az illeszkedés nem megfelelő, az arra utalhat, hogy nem elsőrendű kinetikáról van szó, és más, összetettebb modelleket kell alkalmazni. Az egyik legáltalánosabb komplikáció a halak növekedése a vizsgálat során.

7. A NÖVEKEDÉS OKOZTA HÍGULÁSRA TEKINTETTEL ALKALMAZOTT KORREKCIÓ KINETIKUS BCF ÉS BMF ESETÉN

Ez a szakasz a hal vizsgálat során történő növekedésére (az úgynevezett növekedés okozta hígulásra) tekintettel végzett korrekció standard módszerét ismerteti, amely csak elsőrendű kinetika esetén érvényes. Ha arra utaló jelek láthatók, hogy az elsőrendű kinetika nem valósul meg, ajánlott biostatisztikus szakvéleményét kérni a növekedés okozta hígulásra tekintettel végzett megfelelő korrekció tekintetében, vagy az alább bemutatott, tömeg alapú megközelítést alkalmazni.

Egyes esetekben a növekedés okozta hígulásra tekintettel végzett korrekció módszere nem kellően pontos, vagy néha nem működik (például nagyon lassan tisztuló, gyorsan növekedő halakban vizsgált anyagok esetében a származtatott, növekedés okozta hígulásra tekintettel korrigált tisztulási sebességi állandó, k_{2g} nagyon csekély lehet, így az ennek származtatásához használt két sebességi állandóban kritikus lesz a hiba, és bizonyos esetekben a k_g becslései meghaladhatják a k_2-t). Ilyen esetben alternatív megközelítés (azaz tömeg alapú megközelítés) használható, amely akkor is működik, ha a folyamat nem elsőrendű kinetikát követett, és ekkor nem lesz szükség a korrekcióra. E megközelítés a szakasz végén olvasható.

A növekedési sebességi állandó kivonásának módszere a növekedésre tekintettel történő korrekcióhoz

A standard módszerhez valamennyi egyedi tömeg- és hosszadatot természetes alapú logaritmusára kell konvertálni és az ln(tömeg) vagy ln(1/tömeg) adatokat az idő (nap) függvényében kell ábrázolni, külön a kezelt és a kontrollcsoport vonatkozásában. Ugyanazt az eljárást kell lefolytatni külön a felvételi és a tisztulási fázisra. A növekedés okozta hígulásra tekintettel végzett korrekcióhoz általában megfelelőbb az egész vizsgálat során nyert tömegadatokat használni a növekedési sebességi állandó (k_g) kiszámítása érdekében, de

([1]) Meg kell jegyezni, hogy a k2 becslésének bizonytalanságát tulajdonképpen nem használják a bioakkumulációs modellben, ahol azt lényegében állandónak tekintik a k1 lépcsőzetes illesztési módszerbe történő beillesztésekor. Az eredményként adódó BCF-bizonytalanság ezért eltérő lesz az egyidejű és a lépcsőzetes illesztési módszerben.

▼M7

a felvételi és a tisztulási fázis tekintetében származtatott növekedési sebességi állandók közötti statisztikailag szignifikáns eltérések arra utalhatnak, hogy a tisztulási fázis sebességi állandóját kell alkalmazni. A kezeléssel összefüggő hatások ellenőrzéséhez használhatók a vizes vizsgálatokból származó, a vizsgálati és kontrollcsoportra vonatkozó teljes növekedési sebességek.

Legkisebb négyzetes lineáris korrelációt számítanak a nap függvényében kifejezett ln(haltömeg)-re (és a nap függvényében kifejezett ln(1/tömeg)-re), minden csoport (vizsgálati és kontrollcsoportok, egyedi adatok és nem a napi átlagértékek) és az egész vizsgálat, a felvételi és a tisztulási fázis tekintetében, standard statisztikai eljárásokkal. Az egyenesek meredekségeinek szóródását kiszámítják és felhasználják a meredekségek (növekedési sebességi állandók) közötti eltérések statisztikai szignifikanciájának értékeléséhez ($p = 0,05$), a Student-féle *t*-próba (vagy egynél több koncentráció vizsgálata esetén az ANOVA) alkalmazásával. A növekedésre tekintettel történő korrekció céljaira általában előnyösebb tömegadatokat használni. Az ugyanilyen módon kezelt hosszadatok hasznosak lehetnek a kontroll- és a vizsgálati csoportok kezeléssel összefüggő hatásokra tekintettel történő összehasonlítására. Ha a tömegadatok analízise nem utal statisztikailag szignifikáns eltérésre, a vizsgálati és kontrolladatokat össze lehet vonni, és a vizsgálat céljára teljes halnövekedési sebességi állandót (k_g) lehet számítani, mint a lineáris korreláció általános meredekségét. Ha statisztikailag szignifikáns különbségek figyelhetők meg, az egyes halcsoportokra és/vagy vizsgálati fázisra jellemző növekedési sebességi állandókat külön-külön kell feltüntetni a Vizsgálati jegyzőkönyvben. Az egyes kezelt csoportokból származó sebességi állandót ekkor az adott csoportban kell a növekedés okozta hígulásra tekintettel végzett korrekcióhoz használni. Ha a felvételi és a tisztulási fázis sebességi állandói között statisztikai különbségek figyelhetők meg, a tisztulási fázis tekintetében származtatott sebességi állandókat kell alkalmazni.

A tisztulási sebességi állandó (k_{2g}) meghatározásához a számított növekedési sebességi állandó (k_g) nap^{-1}-ben kifejezve) kivonható a teljes tisztulási sebességi állandóból (k_2).

$$k_{2g} = k_2 - k_g \qquad \text{[A5.27. egyenlet]}$$

A felvételi sebességi állandót elosztják a növekedéssel korrigált tisztulási sebességi állandóval a növekedéssel korrigált kinetikus BCF kiszámításához (amelynek jelölése BCF_{Kg}, vagy BMF_{Kg}).

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[A5.28. egyenlet]}$$

Az étrendi vizsgálathoz származtatott növekedési sebességi állandót az A7.5 egyenletben használják fel a növekedéssel korrigált BMF_{Kg} kiszámításához (vö. 7. függelék).

Tömeg alapú módszer a növekedésre tekintettel történő korrekcióhoz

A fenti, növekedési sebességi állandó kivonásán alapuló módszer alternatívája, ahol nincs szükség növekedésre tekintettel történő korrekcióra, a következőképpen használható. Az elv a tisztulási adatok egész halra vetített tömeg alapján történő használata, és nem koncentrációalapú használata.

A tisztulási fázis szöveti koncentrációit (vizsgálati anyag tömege/ a hal egységnyi tömege) konvertálni kell a vizsgálati anyag tömege/hal hányadosra: a koncentrációkat és az egyes halak tömegét táblázatos formában meg kell feleltetni egymásnak (pl. számítógépes táblázatkezelővel) és az egyes koncentrációkat meg kell szorozni a teljes haltömeggel az adott mérés tekintetében, így adódik a vizsgálati anyag tömege/hal hányadosok sora a tisztulási fázis valamennyi mintája vonatkozásában.

A vizsgálati anyag tömegére vonatkozó adatok természetes alapú logaritmusát a kísérleti idő (tisztulási fázis) függvényében kell ábrázolni, szokás szerint.

▼M7

A vízi expozíciós módszer tekintetében a felvételi sebességi állandót a szokásos módon kell származtatni (lásd a 4. és 6. szakaszt; megjegyzendő, hogy a „szokásos” k_2 értéket kell használni a görbeillesztési egyenletekben a k_1 tekintetében), és a tisztulási sebességi állandót a fenti adatokból kell származtatni. Minthogy a tisztulási sebességi állandó eredményül adódó értéke független a növekedéstől, mivel azt egész halankénti tömeg alapján számították ki, ezt k_{2g}-vel és nem k_2-vel kell jelölni.

8. AZ 5 %-OS LIPIDTARTALOMRA TÖRTÉNŐ LIPIDNORMALIZÁCIÓ (CSAK VÍZI EXPOZÍCIÓS MÓDSZER ESETÉN)

A vízi expozíciós vizsgálatból adódó (kinetikus és állandósult állapoti) BCF-eredményeket a halak alapértelmezett 5 %-os (nedves tömeg) lipidtartalmához viszonyítva is fel kell tüntetni a Vizsgálati jegyzőkönyvben, hacsak nem igazolható, hogy a vizsgálati anyag elsődlegesen nem lipidekben halmozódik fel (pl. egyes perfluorozott anyagok fehérjékhez kapcsolódhatnak). A halakkal kapcsolatos koncentrációs adatokat vagy a BCF-et a nedves tömegre vetített 5 %-os lipidtartalomra kell konvertálni. Ha az anyagkoncentráció és a lipidtartalom mérésére ugyanazokat a halakat használják valamennyi mintavételi ponton, a halban mért minden egyedi koncentrációt korrigálni kell az adott halnak a lipidtartalma vonatkozásában.

$$C_{f,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[A5.29. egyenlet]}$$

ahol:

$C_{f,L}$ = a lipidtartalomra vonatkoztatott koncentráció a halban (mg kg^{-1} nedves tömeg)

L = a lipidfrakció (nedves tömeg alapján)

C_f = a vizsgálatianyag-koncentráció a halban (mg kg^{-1} nedves tömeg)

Ha a lipidanalízist nem végezték el minden, mintába felvett halon, akkor a lipidérték átlaga alapján kerül sor a BCF normalizálására. Az állandósult állapoti BCF tekintetében a kezelt csoportban a felvételi fázis végén rögzített átlagértéket kell használni. A kinetikus BCF normalizációja esetén lehetnek olyan esetek, amelyeknél eltérő megközelítés indokolt, például ha a lipidtartalom jelentősen módosul a felvételi vagy a tisztulási fázis során. Ugyanakkor továbbra is szokás szerint azt az etetési arányt kell alkalmazni, amely a lehető legkisebbre csökkenti a lipidtartalomban beállt drasztikus változásokat.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[A5.30. egyenlet]}$$

ahol:

BCF_{KL} = a lipidtartalomra vonatkoztatott kinetikus BCF (L kg^{-1})

L_n = az átlagos lipidfrakció (nedves tömeg alapján)

BCF_K = a kinetikus BCF (L kg^{-1})

SZAKIRODALOM

(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) E melléklet C.20., *Daphnia magnán végzett reprodukciós vizsgálat című fejezete*.

(3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1: 309-320.

▼**M7**

(4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.

(7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

(9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. T. Am. Fish. Soc. 104: 785-792.

(10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., *et al*., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.

(11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. Can. J. Chem. Eng. 55: 614-622.

(12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere. 9: 3-19.

▼M7

6. függelék

A VÍZI EXPOZÍCIÓS VIZSGÁLAT EGYENLETI SZAKASZA: MINIMALIZÁLT VIZSGÁLATI TERV

E megközelítés mögött az a logika húzódik, hogy a teljes vizsgálatban a biokoncentrációs tényező vagy állandósult állapoti biokoncentrációs tényezőként (BCF_{SS}) határozható meg a vizsgálati anyag halszövetben mért koncentrációja és a vizsgálati anyag vízben mért koncentrációja hányadosának kiszámításával, vagy kinetikus biokoncentrációs tényezőként a (BCF_K) felvételi sebességi állandó k_1 és a tisztulási sebességi állandó k_2 hányadosának kiszámításával. A BCF_K akkor is érvényes, ha az anyag állandósult állapoti koncentrációját nem érik el a felvételi fázisban, feltéve, hogy a felvétel és a tisztulás megközelítőleg elsőrendű kinetikai folyamatokat követ.

Ha a vizsgálati anyag szövetekben lévő koncentrációjának (C_{f1}) mérését az expozíció végén (t_1) végzik el, és a szöveti koncentrációt (C_{f2}) ezt követően egy bizonyos idő elteltével (t_2) újra megmérik, a tisztulási sebességi állandó (k_2) megbecsülhető az 5. függelékben található A5.22. egyenlettel.

A k_1 felvételi sebességi állandó ezt követően algebrikusan meghatározható az 5. függelék A5.23. egyenletével (ahol a C_f megegyezik a C_{f1}-gyel, a t pedig t_1-gyel)(1). A minimalizált terv kinetikus biokoncentrációs tényezője (amelyet BCF_{Km}-ként jelölnek a más módszerek alkalmazásával meghatározott kinetikus biokoncentrációs tényezőktől való megkülönböztetés céljával) így a következő:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[A6.1. egyenlet]}$$

A koncentrációkat vagy eredményeket a növekedés okozta hígulásra tekintettel ki kell igazítani és normalizálni kell a hal 5 %-os lipidtartalmára, amint az az 5. függelékben szerepel.

A minimalizált BCF_{SS} a felvételi fázis végén számított BCF, feltéve, hogy az állandósult állapot létrejött. Ez puszta feltételezés, mivel a mintavételi pontok száma nem elegendő ennek bizonyításához.

$$\text{minimalizáltBCF}_{SS} = \frac{C_{f\ -minSS}}{C_{w\ -minSS}} \qquad \text{[A6.2. egyenlet]}$$

ahol:

$C_{f\text{-}minSS}$ = Koncentráció a halban a felvételi fázis végén a feltételezett állandósult állapotban ($mg \cdot kg^{-1}$ nedves tömeg).

$C_{w\text{-}minSS}$ = Koncentráció a vízben a felvételi fázis végén a feltételezett állandósult állapotban ($mg \cdot l^{-1}$).

SZAKIRODALOM

(1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

▼M7

7. függelék

AZ ÉTRENDI EXPOZÍCIÓS VIZSGÁLAT EGYENLETEKET TARTALMAZÓ SZAKASZA

1. Példa a megfelelő kereskedelmi haltáp alkotóelemeinek mennyiségére

2. Példák tápkiegészítési módszerekre

3. Az asszimilációs hatékonyság és a biomagnifikációs tényező kiszámítása

4. Lipidtartalomra tekintettel történő korrekció

5. A mért nulla időpillanati koncentráció ($C_{0,m}$) és a származtatott nulla időpillanati koncentráció ($C_{0,d}$ *) közötti különbségek* értékelése

6. Útmutatás nagyon gyorsan tisztuló vizsgálati anyagokhoz

1. PÉLDA A MEGFELELŐ KERESKEDELMI HALTÁP ALKOTÓELEMEINEK MENNYISÉGÉRE

Elsődleges alkotóelem	halliszt
Nyersfehérje	≤ 55,0 %
Nyerszsír	≤ 15,0 % ([1])
Nyersrost	≥ 2,0 %
Nedvesség	≥ 12 %
Hamu	≥ 8 %

([1]) Egyes régiókban esetleg csak olyan haltápot lehet beszerezni, amelynek lipidkoncentrációja jóval elmarad e felső határtól. Ilyen esetekben a vizsgálatot a beszállított alacsonyabb lipidkoncentrációjú táppal kell lefolytatni, és az etetési arányt kell megfelelően kiigazítani a hal egészségének megőrzéséhez. Az étrend lipidtartalma mesterségesen nem növelhető több olaj hozzáadásával.

2. PÉLDÁK TÁPKIEGÉSZÍTÉSI MÓDSZEREKRE

Általános szempontok

A kontrolltápokat pontosan úgy kell elkészíteni, ahogy a kiegészített tápokat, de a vizsgálati anyag nélkül.

A kezelt táp koncentrációjának ellenőrzéséhez az adagolt tápból három példányban kell kivonni mintát megfelelő extrakciós módszerrel, valamint a vizsgálatianyag-koncentrációt és a radioaktivitást mérni kell a kivonatokban. Igazolni kell a minták közötti alacsony eltérés melletti nagyfokú (> 85 %) analitikai visszanyerést (az anyagnak a vizsgálat kezdetekor mintavételezett legalább három koncentrációja nem térhet el ± 15 %-ot meghaladóan az átlagtól).

Az étrendi vizsgálat során három tápmintát kell gyűjteni analitikai célból a 0. napon és a felvételi fázis végén a tápban található vizsgálatianyag-tartalom meghatározása érdekében.

A haltáp elkészítése (hígítatlan) folyékony vizsgálati anyaggal

A kezelt haltápban a névleges koncentráció célértékét például 500 μg vizsgálati anyag/g tápban kell meghatározni. A hígítatlan vizsgálati anyag (molekulatömegben vagy konkrét radioaktivitással kifejezett) megfelelő mennyiségét hozzá kell adni a haltáp ismert tömegéhez üvegedényben vagy rotációs bepárló edényben. A haltáp tömegének elegendőnek kell lennie a felvételi fázis tartamára (figyelembe véve, hogy szükség lehet a mennyiségek növelésére az egyes etetésekkor a halak növekedése miatt). A haltápot/vizsgálati anyagot előző este kell összekeverni lassú keveréssel (pl. roto-rack keverővel

▼M7

vagy rotációval, ha rotációs bepárló edényt alkalmaznak). A kiegészített tápot olyan körülmények között kell tárolni, hogy a használatig fennmaradjon a vizsgálati anyag stabilitása a tápkeverékben (pl. hűtés).

A haltáp elkészítése kukoricaolaj vagy halolaj vivőanyaggal

A szilárd vizsgálati anyagokat mozsárban finom porrá kell őrölni. A folyékony vizsgálati anyagok közvetlenül hozzáadhatók a kukorica- vagy halolajhoz. A vizsgálati anyagot kukoricaolaj vagy halolaj ismert mennyiségével kell feloldani (pl. 5–15 ml). Az adagolt olajat mennyiségileg egy megfelelő méretű rotációs bepárló edénybe kell áthelyezni. Az adagolt olaj készítéséhez használt lombikot az olaj két kis alikvotjával kell kiöblíteni, és ezt az edényhez hozzá kell adni annak biztosítása érdekében, hogy az oldott vizsgálati anyag egésze átkerüljön oda. Az olajban való teljes feloldódás/diszperzió biztosítására (vagy ha egynél több vizsgálati anyagot alkalmaznak a vizsgálat során) mikrokeverőt kell behelyezni, a lombikot le kell dugaszolni és a keveréket gyorsan össze kell keverni előző este. A vizsgálathoz szükséges haltáp megfelelő mennyiségét (szokásosan pellet formában) az edénybe kell helyezni, és az edény tartalmát homogénné kell keverni az üvegedény folyamatos, legalább 30 percig tartó forgatásával, de lehetőség szerint előző este. Ezt követően a kiegészített tápot megfelelően kell tárolni (pl. hűteni kell) annak garantálására, hogy a tápban a vizsgálati anyag stabilitása a használatig megmaradjon.

A haltáp elkészítése szerves oldószerrel

A vizsgálati anyag megfelelő (molekulatömegben vagy konkrét radioaktivitással kifejezett), a célzott dózis elérésére alkalmas mennyiségét megfelelő szerves oldószerben fel kell oldani (pl. ciklohexán vagy aceton, 10–40 ml, de nagyobb térfogat alkalmazandó, ha a kiegészítendő táp mennyiségétől függően ez szükséges). Az oldat alikvotját vagy egészét (az adagnak megfelelően hozzáadva) el kell keverni az ahhoz elegendő haltáp megfelelő mennyiségével, hogy a vizsgálat során elérjék az előírt névleges dózisszintet. A tápot/vizsgálati anyagot rozsdamentes keverőtálban lehet keverni, és a frissen adagolt haltáp bent hagyható a tálban vegyifülke alatt két napig (alkalmanként megkeverve), hogy a felesleges oldószer elpárologjon, vagy összekeverhető rotációs bepárló edényben, folyamatos keverés mellett. A felesleges oldószer „elfújható” légárammal vagy nitrogénnel, ha szükséges. Vigyázni kell arra, hogy a vizsgálati anyag ne kristályosodjon az oldószer eltávolítását követően. A kiegészített tápot olyan körülmények között kell tárolni (pl. hűtés), hogy a használatig fennmaradjon a vizsgálati anyag stabilitása a tápkeverékben.

3. AZ ASSZIMILÁCIÓS HATÉKONYSÁG ÉS A BIOMAGNIFIKÁCIÓS TÉNYEZŐ KISZÁMÍTÁSA

Az asszimilációs hatékonyság kiszámításához a teljes tisztulási sebességi állandót először meg kell becsülni az 5. függelék 4. szakasza alapján (a lépcsőzetes módszer alkalmazásával, azaz standard lineáris regresszióval), a tisztulási fázis mintavételezett koncentrációinak átlagát használva. Az etetési arány állandója, I és a felvétel időtartama, t a vizsgálat ismert paraméterei. A C_{food}, a vizsgálati anyag tápban mért koncentrációjának átlaga a vizsgálatban mért változó. $C_{0,\text{d}}$ a felvételi fázis végén a vizsgálati anyag halban lévő koncentrációja általában a tisztulási napok függvényében ábrázolt ln(koncentráció) metszéspontjából származtatható.

Az anyag asszimilációs hatékonysága (a, a vizsgálati anyag bélből való felszívódása) a következőképpen számítható ki:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{food}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[A7.1. egyenlet]}$$

ahol:

$C_{0,d}$ = származtatott koncentráció a halban a felvételi fázis nulla időpillanatában ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$);

▼M7

k_2 = teljes (növekedéssel nem korrigált) tisztulási sebességi állandó (nap^{-1}), az 5. függelék 3. szakaszában szereplő egyenletek szerint számítva;

I = táplálékfelvételi sebességi állandó (g táp g^{-1}·hal nap^{-1}).

C_{food} = koncentráció a tápban (mg·kg^{-1} táp);

t = az etetési időszak tartama (nap)

Ugyanakkor, a számításhoz használt etetési arányt (I) adott esetben ki kell igazítani a hal növekedésével, hogy pontos asszimilációs hatékonyságot (a) kapjunk. Olyan vizsgálatban, amelynek során a halak jelentősen növekednek a felvételi fázisban (ahol nem korrigálják a tápmennyiséget az előre meghatározott etetési arány fenntartása érdekében), a tényleges etetési arány a felvételi fázis előrehaladtával elmarad az előre meghatározottól, így magasabb lesz a „valódi” asszimilációs hatékonyság. (Meg kell jegyezni, hogy a BMF általános számítása szempontjából ez nem fontos, mivel az I feltételei ténylegesen kiesnek az A7.1. és az A7.4. egyenlet között.) A növekedés okozta hígulással korrigált átlagos etetési arány, I_g többféleképpen származtatható, de a leginkább lényegre törő és legprecízebb módszer az ismert növekedési sebességi állandó felhasználása (k_g) a vizsgálati halak tömegének felvételi fázis időpillanataiban történő becslésére, azaz:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[A7.2. egyenlet]}$$

ahol:

W_f (t) = az átlagos haltömeg t felvételi napon

$W_{f,0}$ = az átlagos haltömeg a kísérlet kezdetén

Ezen a módon (legalább) a kísérlet utolsó napjára vonatkozó átlagos haltömeg ($W_{f,end\text{-}of\text{-}uptake}$) megbecsülhető. Minthogy az etetési arányt a $W_{f,0}$ alapján állapították meg, a felvétel egyes napjainak tényleges etetési arányát e két tömegértékkel ki lehet számítani. A növekedéssel korrigált etetési arány, I_g (g táp g^{-1} hal nap^{-1}), amelyet az I helyett használnak, ha a felvételi fázisban gyors növekedés tapasztalható, ezt követően kiszámítható így:

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,end\text{-}of\text{-}uptake}} \qquad \text{[A7.3. egyenlet]}$$

Az asszimilációs hatékonyság (α) meghatározását követően a BMF kiszámítható úgy, hogy az α és az etetési arány állandójának (I, vagy I_g, ha az α kiszámítására azt használják) szorzatát elosztják a teljes tisztulási sebességi állandóval (k_2):

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[A7.4. egyenlet]}$$

A növekedéssel korrigált biomagnifikációs tényezőt is ugyanígy kell kiszámítani, a növekedéssel korrigált tisztulási együttható használatával (az 5. függelék 7. szakaszának megfelelően származtatott érték). Ugyanígy, ha az I_g-t α kiszámítására használják, akkor itt is azt kell használni az I helyett:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[A7.5. egyenlet]}$$

ahol:

α = asszimilációs hatékonyság (a vizsgálati anyag bélből való felszívódása):

k_2 = teljes (növekedéssel nem korrigált) tisztulási sebességi állandó (nap^{-1}), az 5. függelék 3. szakaszában szereplő egyenletek szerint számítva;

▼M7

k_{2g} = növekedéssel korrigált tisztulási sebességi állandó (nap^{-1})

$I.$ = táplálékfelvételi sebességi állandó (g táp g^{-1}·hal nap^{-1}).

A növekedéssel korrigált felezési idő ($t_{1/2}$) a következőképpen számítható ki.

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2g}} \qquad \text{[A7.6. egyenlet]}$$

Az anyag tápból való asszimilációs hatékonysága meg is becsülhető, ha a felvételi fázis lineáris szakaszában (az 1. és a 3. nap között) meghatározták a szöveti maradékokat. Ebben az esetben az anyag asszimilációs hatékonysága (α) a következőképpen határozható meg:

$$\alpha = \frac{C_{fish}(t)}{I \times C_{food} \times t} \qquad \text{[A7.7. egyenlet]}$$

ahol:

$C_{fish}(t)$ = a vizsgálati anyag koncentrációja a halban t időpontban (mg kg^{-1} nedves tömeg).

4. LIPIDTARTALOMRA TEKINTETTEL TÖRTÉNŐ KORREKCIÓ

Ha minden mintavételi intervallum tekintetében ugyanazon a halon mérték a lipidtartalmat, mint amelyiken a kémiai analízist végezték, az egyedi koncentrációkat korrigálni kell a lipidtartalom alapján és az ln(lipidtartalommal korrigált koncentráció)-t a tisztulás függvényében (nap) kell ábrázolni a $C_{0,d}$ és a k_2 levezetéséhez. Az asszimilációs hatékonyság (A7.1. egyenlet) ezt követően lipidtartalom alapján is kiszámítható, a C_{food} lipidtartalom alapján történő használatával (azaz a C_{food}-ot meg kell szorozni a táp átlagos lipidfrakciójával). Az ezt követő, az A7.4. egyenlet és az A7.5. egyenlet alkalmazásával végzett számítások közvetlenül megadják a lipidtartalommal (és a növekedés okozta hígulásra tekintettel) korrigált BMF-et.

Másként a halban és a tápban található átlagos lipidfrakciót (w/w) mind a kezelt, mind a kontrollcsoport tekintetében származtatják (a táp és a kontrollcsoportba tartozó halak tekintetében ez általában az expozíció kezdetén és végén mért adatokból nyerik, a kezelt csoportba tartozó halak tekintetében pedig kizárólag az expozíció végi adatokból). Egyes vizsgálatokban a halak lipidtartalma jelentősen emelkedhet; ilyen esetekben helyénvalóbb a vizsgálati halban lévő átlagos lipidkoncentráció alkalmazása, amelyet az expozíció és a tisztulás végén mért értékekből számítanak ki. Általánosságban a csak a kezelt csoportból származó adatokat mindkét lipidfrakció származtatására használni kell.

A lipidkorrekciós tényezőt (L_c) a következőképpen kell kiszámítani:

$$L_C = \frac{L_{fish}}{L_{food}} \qquad \text{[A7.8. egyenlet]}$$

ahol az L_{fish} és az L_{food} az átlagos lipidfrakció a halban, illetve a tápban.

A lipidkorrekciós tényezőt a lipidtartalommal korrigált biomagnifikációs tényező (BMFL) számítására használják:

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \qquad \text{[A7.9. egyenlet]}$$

5. A MÉRT NULLA IDŐPILLANATI KONCENTRÁCIÓ ($C_{0,m}$) ÉS A SZÁRMAZTATOTT NULLA IDŐPILLANATI KONCENTRÁCIÓ ($C_{0,d}$) KÖZÖTTI KÜLÖNBSÉGEK ÉRTÉKELÉSE

A mért nulla időpillanati koncentrációt ($C_{0,m}$) és a származtatott nulla időpillanati koncentrációt ($C_{0,d}$) össze kell hasonlítani. Ha nagyon hasonlóak, akkor az a tisztulási paraméterek származtatásához használt elsőrendű modellt támasztja alá.

▼M7

Egyes vizsgálatokban jelentős különbség lehet a származtatott nulla időpillanati érték ($C_{0,d}$) és a mért nulla időpillanati átlagkoncentráció ($C_{0,m}$)között (lásd e vizsgálati módszer 159. pontjának utolsó ponttal jelölt bekezdését). Ha a $C_{0,d}$ sokkal alacsonyabb, mint a $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), a különbség arra utalhat, hogy emésztetlen kiegészített táp található a bélben. Ezt kísérletben lehet vizsgálni az eltávolított bél külön analízisével, ha további (egész hal) mintákat vettek és tároltak a felvételi fázis végén. Másfelől, ha a tisztulási fázis lineáris regressziójára alkalmazott, statisztikailag érvényes kiugróértékteszt arra utal, hogy a tisztulási fázis első mintavételi pontja tévesen magas, megfelelő lehet a lineáris regresszió elvégzése a k_2 származtatásához, de el kell hagyni az első tisztulási koncentrációs pontot. Ilyen esetekben, ha a lineáris regresszióban rejlő bizonytalanság nagymértékben csökken, és egyértelmű, hogy megközelítőleg elsőrendű kinetika érvényesült, megfelelő lehet az eredményként adódó $C_{0,d}$ és k_2 érték alkalmazása az asszimilációs hatékonysági számításokban. Ezt teljes körűen meg kell indokolni a Vizsgálati jegyzőkönyvben. Az is lehet, hogy nem elsőrendű kinetika érvényesült a tisztulási fázisban. Ha ez valószínű (azaz a természetes alapú logaritmusra transzformált adatok láthatóan görbét adnak a lineáris regresszió egyeneséhez képest), akkor a k_2 és a $C_{0,d}$ számításai valószínűleg nem lesznek érvényesek, és biostatisztikus szakvéleményét ajánlott kikérni.

Ha a $C_{0,d}$ sokkal magasabb, mint a mért érték ($C_{0,d} >> C_{0,m}$), ez a következőkre utalhat: az anyag nagyon gyorsan ürült ki (azaz a mintavételi pontok az analitikai módszer meghatározási határához közelítettek már a tisztulási fázis igen korai szakaszában, vö. az alábbi 6. szakaszt); eltérés történt az elsőrendű tisztulási kinetikától; a k_2 és a $C_{0,d}$ származtatásához használt lineáris regresszió hibás, vagy a mintavétel valamely időpontjában probléma történt a mért vizsgálati koncentrációkkal. Ilyen esetben a lineáris regresszió ábráját gondosan át kell vizsgálni olyan minták után kutatva, amelyek a meghatározási határon vagy ahhoz közel vannak, keresve a kiugró értékeket és a nyilvánvaló görbületet (ami a nem elsőrendű kinetikára utal), ezt pedig ki kell emelni a Vizsgálati jegyzőkönyvben. A lineáris regresszió bármely későbbi, a becsült értékek javítását szolgáló újraértékelését be kell mutatni és meg kell indokolni. Ha jelentős eltérés figyelhető meg az elsőrendű kinetikához képest, akkor a k_2 és a $C_{0,d}$ számításai valószínűleg nem lesznek érvényesek, és biostatisztikus szakvéleményét ajánlott kikérni.

6. ÚTMUTATÁS NAGYON GYORSAN TISZTULÓ VIZSGÁLATI ANYAGOKHOZ

Amint a vizsgálati módszer 129. pontjában kifejtésre került, egyes anyagok olyan gyorsan tisztulhatnak, hogy megbízható nulla időpillanati koncentráció, $C_{0,d}$ és k_2 nem származtatható, mivel a tisztulási fázis nagyon korai szakaszában (azaz a második tisztulási mintától kezdve) az anyag ténylegesen nem mérhető (a koncentrációk a jelentés szerint a meghatározási határon vannak). Ez a helyzet volt megfigyelhető az e vizsgálati módszer alátámasztására végzett laboratóriumok közötti összehasonlításban a benzo[a]pirén esetén, és ezt rögzítették a módszer validálási jelentésében is. Ilyen esetekben a lineáris regresszió nem végezhető el megbízhatóan, és valószínűleg irreálisan magasra becsüli a $C_{0,d}$-t, amelynek következtében az asszimilációs hatékonyság jóval nagyobb lesz, mint 1. Ezekben az esetekben ki lehet számítani a k_2 konzervatív becslését és a BMF felső határát.

A tisztulási fázis azon adatpontjainak felhasználásával, ahol a koncentrációt mérték, az első „nem érzékelt” koncentrációval (a meghatározási határon megállapított koncentráció) bezárólag, a lineáris regresszió (a természetes alapú logaritmusra transzformált koncentrációs adatok az idő függvényében) megadja a k_2 becslését Az ilyen típusú esetek tekintetében valószínű, hogy csak két adatpontot vonnak be (pl. a tisztulás 1. és 2. mintavételi napja), és ezt követően a k_2 megbecsülhető az 5. függelék A5.22. egyenletének felhasználásával. Ezt a becsült k_2 értéket lehet használni az asszimilációs hatékonyság A7.1. egyenlet szerinti becsléséhez, ahol az egyenletben szereplő $C_{0,d}$ értéket a mért nulla időpillanati koncentrációval ($C_{0,m}$) lehet helyettesíteni azokban az esetekben, ahol a $C_{0,d}$-t egyértelműen jóval magasabbra

▼**M7**

becsülik, mint amit a vizsgálattal el lehetett volna érni. Ha a $C_{0,m}$ nem mérhető, a halszövetekben megfigyelhető érzékelési határt kell alkalmazni. Ha egyes esetekben az α érték > 1, az asszimilációs hatékonyságot legrosszabb esetben 1-nek kell feltételezni.

A legnagyobb BMF_K ezt követően megbecsülhető az A7.4. egyenlettel, és azt „jóval kisebb mint” (<<) értékként kell megadni. Ha például 3 %-os etetési aránnyal végeznek vizsgálatot, a tisztulási felezési idő pedig kevesebb, mint három nap, a legrosszabb esetre jellemző α = 1, akkor a BMF_K valószínűleg körülbelül 0,13 alatt lesz. Tekintve e becslés célját és azt a tényt, hogy az értékek jellegüket tekintve konzervatívak lesznek, nem szükséges azokat korrigálni a növekedés okozta hígulásra, illetve a hal és a táp lipidtartalmára tekintettel.

▼M7

8. függelék

A KÍSÉRLETI BCF-EK ÉTRENDI EXPOZÍCIÓS VIZSGÁLAT SORÁN GYŰJTÖTT ADATOK ALAPJÁN TÖRTÉNŐ BECSLÉSÉT SZOLGÁLÓ MEGKÖZELÍTÉSEK

Az étrendi módszer azért került be ebbe a vizsgálati módszerbe, hogy vizsgálni lehessen olyan anyagok bioakkumulációját, amelyek gyakorlatilag a vízi expozíciós módszerrel nem vizsgálhatók. A vízi expozíciós módszer biokoncentrációs tényezőt ad, míg az étrendi módszer közvetlenül tájékoztat az etetés biomagnifikációs potenciáljáról. Számos kémiai biztonsági rendszerben a vízi biokoncentrációval kapcsolatos információra van szükség (például a kockázatértékelésben és a globálisan harmonizált osztályozási rendszerben). Éppen ezért az étrendi vizsgálat során generált adatokat fel kell használni a vízi expozíciós módszer szerint lefolytatott vizsgálatokkal összehasonlítható biokoncentrációs tényező becslésére ([1]). Ez a szakasz kifejti azokat a megközelítéseket, amelyeket követni lehet ennek elvégzéséhez, ugyanakkor elismeri az e becslésekben rejlő hiányosságokat is.

Az étrendi vizsgálat méri a tisztulást, hogy megadja a tisztulási sebességi állandót, k_2. Ha a rendelkezésre álló adatok alapján felvételi sebességi állandó becsülhető olyan helyzetben, amikor a halat vízen keresztül tették ki a vizsgálati anyagnak, megbecsülhető a kinetikus BCF.

A felvételi sebességi állandó vizsgálati anyagnak való vízi expozíció tekintetében történő becslése számos feltevésre épül, amelyek közül bármelyik hozzájárulhat a becslés bizonytalanságához. Emellett a BCF becslésének e megközelítése feltételezi, hogy a teljes tisztulási sebesség (ideértve az olyan hozzájáruló tényezőket, mint a testben való megoszlás és az egyedi tisztulási folyamatok) független a vizsgálati anyag által a test anyagterhelésének előidézéséhez használt expozíciós módszertől.

Az e becslési megközelítésben rejlő főbb feltételezések az alábbiak szerint foglalhatók össze:

Az étrendi felvételt követő tisztulás ugyanolyan, mint a vízi expozíciót követő tisztulás egy adott anyag tekintetében.

A vízből való felvétel elsőrendű kinetikát követ.

A felvétel becslésére használt módszertől függően:

— a felvétel korrelálható kizárólag a hal tömegével

— a felvétel korrelálható kizárólag az anyag oktanol-víz megoszlási együtthatójával

— a felvétel korrelálható a hal tömegének és az anyag oktanol-víz megoszlási együtthatójának kombinációjával

— a felvételt a vízi expozíciós vizsgálatban a gyakorlatban esetleg befolyásoló tényezők, mint az anyag biológiai hasznosíthatósága, a készülékre való lerakódása, a molekulaméret stb. csekély hatással járnak

— és döntően:

A felvétel becslési módszerének kifejlesztéséhez használt adatbázis („oktatóanyag”) reprezentatív a vizsgálat alá vont anyag szempontjából.

A nyilvánosság számára hozzáférhető szakirodalom több publikációjában szerepelnek egyenletek, amelyek a hal által a vízből a kopoltyún keresztül történő felvételt egy anyag oktanol-víz megoszlási együtthatójához, a haltömeghez (1) (2) (3) (4), a térfogathoz és/vagy a lipidtartalomhoz, a membrán permeációjához/diffúziójához (5) (6), a hal légcsere-térfogatához (7) kapcsolják, és amelyeket illékonysági/anyagmérleg-megközelítésből származtatnak (8) (9) (10). Ezzel összefüggésben e módszereket Crookes és Brooke (11) értékeli részletesen.

([1]) A természetben a vízi környezetben a legnagyobb expozíciót előidéző út a felvétel a rendkívül víztaszító anyagok esetében, így a becsült BCF szorosan nem jeleníti meg az ilyen anyag bioakkumulációs potenciálját.

▼M7

Barbernek (12) az étrendi felvételen alapuló bioakkumuláció modellezésére összpontosító publikációja szintén hasznos e tekintetben, mivel adatokat tartalmaz a kopoltyún keresztüli felvétel sebességi modelljeiből. A 2004-es étrendi protokoll (13) háttérdokumentumának egy szakaszát is e szempontnak szentelték.

E modellek legtöbbjét korlátozott adatbázisok felhasználásával vezették le. Az olyan modellek esetében, ahol rendelkezésre állnak a modell kifejlesztéséhez használt adatbázisok részletei, úgy tűnik, hogy az alkalmazott anyagok hasonló szerkezetűek vagy hasonló osztályba tartoznak (a rendeltetést tekintve, pl. szerves klórtartalmú anyagok). Ez is hozzáadódik ahhoz a bizonytalansághoz, amely egy adott modell másfajta anyag felvételi sebességi állandójának előrejelzésére történő használatában rejlik, a vizsgálatspecifikus megfontolások, mint a faj, a hőmérséklet stb. mellett.

A rendelkezésre álló módszerek áttekintése (11) kiemelte, hogy egyik módszer sem „helytállóbb” a másiknál. Éppen ezért az alkalmazott modellt egyértelműen indokolni kell. Ahol több olyan módszer áll rendelkezésre, amelynek a használata indokolható, körültekintőnek tűnik több k_1 (és így BCF) becslés bemutatása, illetve k_1 (és BCF) értéktartományok megadása a többféle felvételi becslési módszer szerint. Ugyanakkor, tekintettel a modelltípusokban és az azok kidolgozásához használt adatsorokban rejlő különbségekre, az e különbözőképpen származtatott becslések átlagértékének alkalmazása nem mindig helyénvaló.

Egyes kutatók azt javasolták, hogy a BCF ilyen becsléseit korrigálják a biológiai hasznosíthatóságra tekintettel, hogy figyelembe vegyék az anyag oldott szerves szénre (DOC) való adszorpcióját a vízi expozíciós feltételek mellett, és így összhangba hozzák a becslést a vízi expozíciós vizsgálatok eredményeivel (pl. (13) (14)). Ez a korrekció ugyanakkor nem feltétlenül helytálló, tekintettel a vízi expozíciós vizsgálathoz „a legrosszabb eset” becslése vonatkozásában szükséges alacsony DOC-szintekre (azaz a biológiailag hasznosítható anyagok aránya az oldatban mért anyagokhoz). A nagymértékben víztaszító anyagok esetében a kopoltyún keresztül történő felvétel korlátozott lehet a kopoltyúfelülethez közeli passzív diffúzió sebessége miatt, ebben az esetben lehetséges, hogy a korrekció ezt a hatást veszi figyelembe, és nem azt, amelyre eredetileg szánták.

Tanácsos azokra a módszerekre összpontosítani, amelyekhez olyan ráfordításokra van szükség, amelyek esetében azonnal rendelkezésre állnak adatok az itt bemutatott étrendi vizsgálatban vizsgált anyagok vonatkozásában (azaz a log K_{OW}, a haltömeg). Összetettebb ráfordításokat igénylő más módszerek is alkalmazhatók, de további mérésekre lehet szükség a vizsgálat során, vagy részletesen ismerni kell a vizsgálati anyagot, illetve a halfajt, amely információ lehet, hogy nem széles körben elérhető. Emellett a modell megválasztását befolyásolhatja a validálási szint és az alkalmazhatósági terület (az áttekintés és a különböző módszerek összehasonlítása tekintetében lásd a (11) hivatkozást).

Szem előtt kell tartani, hogy az eredményül adódó k_1 becslés és a becsült BCF bizonytalan, és azt a bizonyító erő elemzésén alapuló megközelítés szerint kell kezelni a származtatott BMF-fel és az anyag paramétereivel (pl. molekulaméret) együtt, hogy átfogó képet lehessen kapni az anyag bioakkumulációs potenciáljáról. E paraméterek értelmezése és alkalmazása a szabályozói kerettől függhet.

SZAKIRODALOM

(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. HALIVADÉKOK NÖVEKEDÉSI VIZSGÁLATA

1. MÓDSZER

E növekedéssel kapcsolatos toxicitásvizsgálat megfelel az OECD TG 215-nek (2000).

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat célja annak megállapítása, hogy a halivadékok növekedésére milyen következményekkel jár, ha hosszabb időn keresztül vegyi anyagok hatásának vannak kitéve. E vizsgálat egy olyan módszeren alapul, amelyet az Európai Unión belül fejlesztettek ki, és körvizsgálatnak vetették alá (1) (2) annak felmérésére, hogy átfolyási feltételek mellett egyes vegyi anyagok milyen hatásokat gyakorolnak a szivárványos pisztráng ivadékának *(Oncorynchus mykiss)* növekedésére. Más, kellően dokumentált halfajok is felhasználhatók. Növekedési vizsgálatot végeztek már például zebrahalon *(Danio rerio)* ([1]) (3) (4) és rizshalon (medaka, *Oryzias Latipes)* (5) (6) (7).

Lásd még az Általános bevezetés C. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Legalacsonyabb megfigyelhető hatást okozó koncentráció (LOEC): a vizsgált anyag azon legalacsonyabb kísérleti koncentrációja, amelynél a kontrollal összevetve még megfigyelhető az anyag egy jelentős hatása ($p < 0,05$). Azonban a LOEC fölötti valamennyi kísérleti koncentrációnak olyan ártalmas hatást kell kifejtenie, amely legalább azonos a LOEC-nél megfigyelttel, vagy erősebb annál.

Megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC): a közvetlenül a LOEC alatti kísérleti koncentráció.

EC_x: e vizsgálati módszerben a vizsgált anyag azon koncentrációja, amely – a kontrollal összevetve – x % eltérést okoz a növekedés ütemében.

Betelepítési arány: a halak nedvesen mért tömege egységnyi mennyiségű vízben.

Betelepítési sűrűség: a halak száma egységnyi mennyiségű vízben.

Halegyedek specifikus növekedési üteme: az egyed növekedésének üteme, a kiindulási tömegéhez viszonyítva.

Specifikus növekedési ütem a tartály átlagában: egy tartályban lévő halpopuláció átlagos növekedési üteme egy adott koncentráció mellett.

Pszeudospecifikus növekedési ütem: az egyed növekedési üteme a tartályban lévő halpopuláció kezdeti súlyának átlagához viszonyítva.

([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. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A növekedési ütemük exponenciális szakaszában lévő halivadékokat – megmérésük után – kísérleti tartályban helyezik el, és szubletális koncentrációjú, vízben oldott vizsgált anyag hatásának teszik ki, átfolyást biztosítva, vagy amennyiben ez nem lehetséges, akkor megfelelő félstatikus (statikus-megújítási) feltételek mellett. A vizsgálat időtartama 28 nap. A halakat naponta etetik. A táplálék adagolását a halak kiindulási súlya alapján határozzák meg; az adagokat 14 nap után újra lehet számítani. A kísérlet végén a halakat ismét lemérik. Regressziós modell segítségével elemezni kell a vizsgált anyag hatásait a növekedés ütemére, azon koncentráció meghatározása érdekében, amely a növekedés ütemében x % eltérést okoz, azaz ECx (pl. EC_{10}, EC_{20}, EC_{30}) eltérést. Alternatív módon, az adatokat össze lehet hasonlítani a kontrollértékekkel, a „legalacsonyabb megfigyelhető hatást okozó koncentráció” (LOEC), majd annak alapján a „megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció” (NOEC) meghatározása érdekében.

1.4. A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

Rendelkezésre kell hogy álljanak az e vizsgálat céljára kiválasztott fajokkal lehetőleg korábban már elvégzett, akut toxicitási vizsgálatok eredményei (lásd a C.1. vizsgálati módszert). Ez azt jelenti, hogy a vizsgált anyag vízoldhatósága és gőznyomása ismert, és dokumentált pontosságú, megbízható analitikai módszer áll rendelkezésre a vizsgált oldatokban lévő vizsgált anyag számszerűsítéséhez, továbbá rendelkezésre állnak az észlelés korlátaira vonatkozó adatok is.

A hasznos információk közé tartozik még a szerkezeti képlet, az anyag tisztasága, stabilitása vízzel és fénnyel szemben, a pK_a- és P_{ow}-értékek, valamint a gyors biológiai lebomlásra vonatkozó vizsgálatok eredményei is (lásd a C.4. vizsgálati módszert).

1.5. A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

A vizsgálat érvényességéhez az alábbi feltételeknek kell teljesülniük:

— a vizsgálat végén a mortalitási arány a kontrollcsoportban nem haladhatja meg a 10 %-ot,

— a kontrollcsoportbeli halak átlagos súlyának megfelelő mértékben kell növekednie ahhoz, hogy lehetővé tegye a növekedési ütemben egy már szignifikánsnak tekinthető minimális eltérés érzékelését. Egy „körvizsgálat” (2) kimutatta, hogy a szivárványos pisztráng esetében a kontrollcsoportbeli halak átlagos tömegének 28 nap alatt legalább a kiindulási átlagtömegük felével (azaz 50 %-kal) kell növekednie; pl. kiindulási tömege 1 g/hal (= 100 %), végső tömege 28 nap elteltével ≥ 1,5 g/hal (≥ 150 %),

— a kísérlet során az oldott oxigén koncentrációját mindvégig legalább a levegőtelítettségi érték (ASV) 60 %-án kell tartani,

— a kísérleti tartályokban a víz hőmérséklete a kísérlet során soha sem térhet el ± 1 °C- nál nagyobb mértékben, és a hőmérsékletet a vizsgált fajra nézve meghatározott hőmérséklet-tartományban egy 2 °C-nyi sávon belül kell tartani (1. függelék).

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Felszerelés**

Normál laboratóriumi felszerelés és különösen az alábbiak:

— oxigéntartalom- és pH-érték-mérők,

▼B

— a víz keménységi fokának és lúgosságának mérésére szolgáló berendezések,

— a hőmérséklet szabályozására és lehetőleg folyamatos figyelemmel kísérésére alkalmas készülékek,

— kémiailag semleges anyagból készült és az ajánlott betelepítési aránynak és betelepítési sűrűségnek megfelelő kapacitású tartályok (lásd 1.8.5. pont és az 1. függelék),

— megfelelő pontosságú mérleg (azaz ± 0,5 % pontosságú).

1.6.2. **Víz**

A vizsgálat céljaira bármilyen víz felhasználható, amelyben a vizsgált fajok kellően hosszú ideig túlélik a vizsgálati körülményeket, és növekednek. A víz minőségét a kísérlet során mindvégig azonos szinten kell tartani. A víz pH-értékének a 6,5–8,5 tartományon belül kell lennie, azonban egy adott vizsgálat során csak ± 0,5 pH-egységgel térhet el a kiindulási értéktől. Javasolt a 140 mg/l ($CaCO_3$) vízkeménység választása. Annak biztosítására, hogy a víz összetétele ne befolyásolja túlzottan a vizsgálat eredményeit (pl. mert komplexet képez a vizsgált anyaggal), időnként mintákat kell venni elemzésre. Mérni kell a következőket: a nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd és Ni), a fontosabb anionok és kationok (pl. Ca, Mg, Na, K, Cl és SO_4), a peszticidek (pl. összes szerves foszfor és összes szerves klór tartalmú peszticidek), az összes szerves szén és a szuszpendált szilárd anyagok koncentrációját, például háromhavonta, amennyiben a hígítóvízről tudott, hogy viszonylag állandó minőségű. Amennyiben a víz minősége bizonyítottan konstans legalább egy éven keresztül, akkor ritkábban, nagyobb időközökkel is lehet ellenőrző méréseket végezni (pl. csak hathavonta egyszer). Az elfogadható minőségű hígítóvíz néhány kémiai tulajdonságának felsorolása a 2. függelékben található.

1.6.3. **Vizsgált oldatok**

A kiválasztott koncentrációjú vizsgált oldatok a törzsoldat hígításával készíthetők el.

A törzsoldatot lehetőleg a vizsgált anyagnak a hígítóvízbe, mechanikai eszközök (pl. keverő, ultrahang) segítségével történő bekeverésével vagy hozzákeverésével kell elkészíteni. Telítési oszlopok (oldhatósági oszlopok) is felhasználhatók a megfelelő koncentrációjú törzsoldat elkészítéséhez.

Egyes esetekben szükség lehet oldószerek vagy diszpergálószerek (oldódást segítő szerek) használatára a megfelelő koncentrációjú törzsoldat elkészítéséhez. Ilyen alkalmas oldószer lehet az aceton, etanol, metanol, dimetil-szulfoxid, dimetil-formamid és a trietilénglikol. Alkalmas diszpergálószer lehet például: Cremophor, RH40, Tween 80, Metilcellulóz 0,01 % és a HCO-40. Kellő figyelemmel kell eljárni a biológiailag gyorsan lebomló szerek (pl. aceton) és/vagy az erősen illékony összetevők használatakor, mivel ezek az átfolyási vizsgálatok során fellépő baktériumszaporodás kapcsán gondokat okozhatnak. A diszpergálószerek nem gyakorolhatnak lényeges hatásokat a halak növekedésére és láthatóan kedvezőtlen hatásokat az ivadékokra, amit csak egy oldószerrel végzett ellenőrző vizsgálat tárhat fel.

▼B

Az átfolyási vizsgálatok céljára olyan rendszert kell használni, amely folyamatosan biztosítja és hígítja a vizsgált anyag törzsoldatát (pl. egy adagolószivattyú, proporcionális hígító vagy egy telítőrendszer), annak érdekében, hogy a kísérleti tartályhoz eljusson a hígítóoldat. A kísérlet során időnként – lehetőleg naponta – ellenőrizni kell a törzsoldatok és a hígítóvíz áramlási sebességét, amelynek értéke nem változhat 10 %-nál nagyobb mértékben a vizsgálat során. Egy „körvizsgálat" (2) bizonyította, hogy a szivárványos pisztrángok esetében hat liter/gramm hal/nap mértékű vízcserélődési sebesség elfogadható (lásd 1.8.2.2. szakasz).

Félstatikus (megújítási) vizsgálatok során a közeg megújításának gyakorisága a vizsgált anyag stabilitásától függ, azonban ajánlott a víz napi cseréje. Amennyiben korábbi stabilitási vizsgálatok (lásd 1.4. pont) arra mutattak rá, hogy nem stabil a vizsgált anyag koncentrációja (azaz kívül esik a névleges koncentráció 80–120 %-os tartományán, vagy a kiinduláskor mért koncentráció 80 %-a alá csökken) a megújítási időszak során, akkor fontolóra kell venni egy átfolyási vizsgálat elvégzését.

1.6.4. **A halfajok kiválasztása**

E vizsgálat céljaira az ajánlott halfaj a szivárványos pisztráng *(Oncorhynchus mykiss),* mert a legtöbb tapasztalat eddig az e fajjal folytatott „körvizsgálatokból" származik (1) (2). Azonban más, kellően dokumentált halfajok is felhasználhatók, de ilyenkor az eljárást esetleg módosítani kell a megfelelő vizsgálati körülmények biztosítása érdekében. Például zebrahal *(Danio rerio)* (3) (4) és rizshal (medaka, *Oryzias Latipes)* (5) (6) (7) vizsgálatából is szereztek már növekedésivizsgálat-tapasztalatokat. Ebben az esetben a jelentésnek tartalmaznia kell az eltérő fajok és kísérleti módszer kiválasztásának indoklását.

1.6.5. **A halak tartása**

A kísérleti halakat egyetlen tenyészet – lehetőleg egy ivásból származó – populációjából kell kiválasztani, és a halakat a vizsgálat megkezdése előtt legalább két hétig a kísérlet során alkalmazandó körülmények, vízminőség és megvilágítás mellett kell tartani. A napi etetéskor minimálisan a testsúly 2 %-ának megfelelő adagokat kell kapniuk, a kéthetes tartási időszak és a vizsgálat ideje alatt pedig lehetőleg a testsúly 4 %-ának megfelelő mennyiséget.

Egy 48 órás szoktatási időszakot követően fel kell jegyezni a mortalitási arányt, és alkalmazni kell az alábbi kritériumokat:

— amennyiben hét nap alatt a populáció mortalitása 10 %-nál magasabb, az egész állományt ki kell cserélni,

— 5 és 10 % közötti mortalitás esetén: további hét nap akklimatizációs időszak beiktatása után – amennyiben a mortalitási arány ezt követően is magasabb 5 %-nál – az egész állományt ki kell cserélni,

— ha hét nap után a mortalitás 5 % alatt marad, az állomány elfogadható.

A halak a vizsgálat előtti két hétben és a vizsgálat során nem kaphatnak betegség miatti kezelést.

▼B

1.7. A VIZSGÁLAT KIALAKÍTÁSA

A „vizsgálat kialakítása” meghatározás a kísérleti koncentráció számának és osztásközeinek, az egyes koncentrációszintekhez használt tartályok számának és a halak tartályonként létszámának a megválasztását jelenti. Ideális esetben a vizsgálatot az alábbiakra tekintettel kell megtervezni:

— a vizsgálat célja,

— az alkalmazandó statisztikai elemzési módszer,

— a kísérlethez szükséges anyagok beszerezhetősége és költsége.

Amennyiben lehetséges, a kísérleti cél megfogalmazásában rögzíteni kell, hogy milyen statisztikai pontossági szinten kell egy adott nagyságú eltérésnek (pl. a növekedés ütemének) érzékelhetőnek lennie, vagy – alternatív módon – milyen pontossággal kell tudni megbecsülni az EC_x (pl. x = 10-nél, 20-nál vagy 30-nál, és lehetőleg nem kevesebb, mint 10) értékét. Ezek nélkül nem lehet határozott leírást adni a vizsgálatok terjedelméről.

Fontos annak felismerése, hogy a valamelyik statisztikai elemzési módszer alkalmazására optimálisnak (az erőforrások legjobb kihasználását biztosítónak) bizonyult módszer nem szükségszerűen optimális egy másik módszer esetében. A LOEC/NOEC becsléséhez ajánlott tervezés ezért nem feltétlenül azonos a regressziós analízis esetére ajánlottal.

A Stephan és Rogers (9) által tárgyalt okok miatt a regressziós elemzés a legtöbb esetben megfelelőbb, mint a varianciaelemzés. Amennyiben azonban nem található megfelelő regressziós modell ($r_2 < 0,9$), akkor a NOEC/LOEC módszert kell használni.

1.7.1. **A regressziós analízis kialakítása**

A regresszióval elemzendő vizsgálat kialakításakor a legfontosabb szempontok a következők:

— a vizsgálat során alkalmazott koncentrációnak magában kell foglalnia azon hatáskoncentrációt (pl. $EC_{10,20,30}$) és azon koncentrációtartományt, amelyen belül a vizsgált anyag hatását értékelni szükséges. Azon pontossági szint, amellyel a hatáskoncentrációra vonatkozó becsléseket el lehet végezni, akkor lesz a legmegfelelőbb, ha a hatáskoncentráció a vizsgált koncentrációtartomány közepénél helyezkedik el. A megfelelő koncentrációértékek kiválasztásához hasznos lehet egy előzetes behatároló vizsgálat elvégzése,

— a megfelelő statisztikai modellezés érdekében a vizsgálat során legalább egy kontrolltartályt és még további öt, különböző koncentrációjú közeggel feltöltött kiegészítő tartályt kell alkalmazni. Adott esetben, diszpergálószer használatakor egy, a diszpergálószert a legmagasabb vizsgált koncentrációban tartalmazó kontrolltartályt kell beiktatni a vizsgált sorozat mellé (lásd 1.8.3. és 1.8.4. szakasz),

— megfelelő mértani vagy logaritmikus sorozatot (10) (lásd a 3. függelék) lehet használni. Ajánlott a kísérleti koncentrációk logaritmikus osztásközének használata,

▼B

— amennyiben hatnál több tartály áll rendelkezésre, akkor a többlettartályokat vagy párhuzamos vizsgálatra lehet felhasználni, vagy a koncentrációtartományt fel lehet osztani az osztásköz csökkentése érdekében. Mindkét módszer egyformán javasolt.

1.7.2. **A NOEC/LOEC becslésének módja varianciaelemzés (ANOVA) használatával**

Lehetőleg minden koncentrációszinten legyen egy ismétlőtartály, és a statisztikai elemzést az egyes tartályok esetében kell elvégezni (11). Az ilyen ismétlőtartályok nélkül a halak tömegének egyedi eltérésén túl nem lehet figyelembe venni a tartályok közötti eltéréseket. Korábbi tapasztalatok (12) azonban azt mutatják, hogy – a vizsgált esetben – a „tartályok közötti" változékonyság nagyon csekély volt a „tartályon belüli" (azaz a halak közötti) változékonyság képest. Ezért az egyes halak szintjén végzett statisztikai elemzés elvégzése viszonylag elfogadható alternatíva.

Hagyományosan legalább ötféle, mértani sorozatot alkotó kísérleti koncentrációt használnak, lehetőleg a 3.2 értéket meg nem haladó szorzótényező alkalmazásával.

Általában, ha a vizsgálatokat párhuzamos tartályok használatával végzik, az ilyen kontrolltartályok száma, s ennélfogva a halak száma is az egy koncentrációhoz tartozó teszttartályok számának (amelyek azonos méretűek) kétszerese (13) (14) (15). Ellenkező esetben, azaz párhuzamos tartályok nélkül a kontrollcsoportban lévő halak száma azonos az egyes kísérleti koncentrációk alapján vizsgált halak számával.

Amennyiben a varianciaelemzés (ANOVA) a tartályokon alapul, nem pedig az egyes halakon (ami megkövetelné a halak egyedi jelölését vagy „pszeudospecifikus" növekedési ütemek használatát a számításokhoz – lásd 2.1.2. szakasz), akkor elegendő számú párhuzamos tartályra van szükség az egyes „koncentrációszintek közötti tartályok" standard eltérésének meghatározásához. Ez azt jelenti, hogy a varianciaelemzésben a hibák szabadságfoka legalább 5 kell hogy legyen (11). Amennyiben csak a kontrollok számát duplázzák meg, fennáll a veszélye annak, hogy a hiba variabilitása torzul, mivel a kérdéses növekedési ütemek átlagértékét követve növekedhet. Mivel a növekedési ütem valószínűleg a koncentráció növekedésével arányosan csökken, ez általában a variabilitás túlbecsléséhez vezet.

1.8. ELJÁRÁS

1.8.1. **A vizsgálati halak kiválasztása és lemérése**

Fontos a halak testtömegeltéréseinek minimumra csökkentése a vizsgálat elején. A vizsgálatok során használatra javasolt különböző halfajok megfelelő mérettartományait az 1. függelék tartalmazza. A vizsgálathoz felhasznált teljes halállományon belül a vizsgálat kezdetén az egyedek testtömegének tartományát ideális esetben az átlagos testtömeg ±10 százalékán belül célszerű tartani, de az eltérés semmiképp sem lehet több 25 %-nál. Az átlagos testtömeg előzetes becslése céljából javasolt a vizsgálat előtt a halak egy részmintájának a tömegét lemérni.

▼B

A vizsgálat megkezdése előtt a halállomány populációjának táplálékát 24 órán keresztül vissza kell tartani. A halakat ezt követően kell véletlenszerűen kiválasztani. Általános altatószerrel (pl. MS 222 egy egységére számolt kétegységnyi szódabikarbonát hozzáadásával semlegesített 100 mg/l triazin-metán-szulfonát(MS 222) vizes oldata) elkábított halak nedves (itatóspapírral szárított) egyedi súlyát az 1. függelékben megadott pontossággal kell lemérni. A meghatározott mérettartományon belüli halakat kell megtartani és véletlenszerűen elosztani a tesztedények között. Fel kell jegyezni az egyes edényekbe helyezett halak nedvesen mért össztömegét. A halak altatása és megfogása (ideértve az itatóspapírral történő szárítást és a mérlegelést is) stresszt és a halivadékok sérülését okozhatja, különösen a kisméretű fajok esetében. Ezért a halivadékok kezelésekor maximális gonddal kell eljárni, hogy elkerüljük a stresszhatásokat és sérüléseket.

A halakat a kísérlet 28. napján újra le kell mérni (lásd 1.8.6. szakasz). Amennyiben azonban a táplálékadagolás újraszámítása szükséges, az ismételt mérlegelést már a 14. napon el lehet végezni (lásd 1.8.2.3. szakasz). A halláp adagolásának módosításához a halak méretének lefényképezése is megfelelő.

1.8.2. **Expozíciós feltételek**

1.8.2.1. *Időtartam*

A vizsgálat időtartama > 28 nap.

1.8.2.2. *Betelepedési arány és betelepedési sűrűség*

Fontos, hogy a betelepedési arány és a betelepedési sűrűség megfeleljen a kísérlethez felhasznált halfajoknak (lásd 1. függelék). Amennyiben túl magas a betelepedési sűrűség, akkor a túlzsúfoltság okozta stressz a növekedési ütem lassulásához és esetleg megbetegedésekhez vezet. A túl alacsony betelepedési sűrűség territóriumfoglalási viselkedésmódokat idézhet elő, ami szintén befolyásolja a növekedési ütemet. A betelepedési sűrűséget mindenképpen annyira alacsonyan kell tartani, hogy a vízben oldott oxigén koncentrációját külön levegőztetés nélkül is legalább a levegőtelítettségi érték 60 %-ának megfelelő szinten lehessen tartani. Egy körvizsgálat (3) kimutatta, hogy a szivárványos pisztrángok esetében 40 liternyi vízben 16 darab, egyenként 3–5 grammos hal elhelyezése az elfogadható. A vízcsere ajánlott gyakorisága a kísérlet során 6 liter/gramm hal/nap.

1.8.2.3. *Táplálás*

A halakat az elfogadható növekedési ütemet biztosítóan adagolt megfelelő haltáppal (1. függelék) kell etetni. Gondosan kerülni kell a mikrobatenyészetek kialakulását és a víz zavarossá válását. A szivárványos pisztrángok esetében a halak testsúlya 4 %-nak megfelelő arányú napi tápadagolás elégíti ki legvalószínűbben e feltételeket (3) (16) (17) (18). A napi adagot két egyenlő részre lehet osztani és beadagolni, legalább öt óra különbséggel. Az adagolást mindegyik tesztedény esetében a teljes kiindulási haltömeg alapján kell megállapítani. Amennyiben a halakat a 14. napon ismét lemérik, az adagolás mennyisége újraszámolható. A mérlegelés előtt a táplálékot 24 órán keresztül vissza kell tartani.

▼B

Az el nem fogyasztott tápot és az ürüléket minden nap gondosan, szívás útján kell eltávolítani a tartályok aljáról.

1.8.2.4. *Megvilágítás és hőmérséklet*

A megvilágítási időszakokat és a víz hőmérsékletét a vizsgált halfajok sajátosságaihoz kell igazítani (1. függelék).

1.8.3. **Vizsgálati koncentrációk**

A vizsgálat felépítésétől függetlenül a vizsgált anyagból általában ötféle koncentráció használata szükséges (lásd 1.7.2. szakasz). A vizsgált anyag toxicitásának előzetes ismerete (pl. egy akut vizsgálat és/vagy tartománykeresési vizsgálatok alapján) segíthet a megfelelő koncentrációértékek kiválasztásában. Az ötnél kevesebb koncentrációszint alkalmazását indokolni kell. A legmagasabb kísérleti koncentráció nem haladhatja meg az anyag vízoldhatósági határértékét.

Amennyiben diszpergálószert használnak a törzsoldat előkészítéséhez, az oldat végső koncentrációja nem lehet több, mint 0,1 ml/liter, és lehetőleg azonosnak kell lennie az összes tesztedényben (lásd 1.6.3. szakasz). Mindenesetre minden lehetséges erőfeszítést meg kell tenni az ilyen anyagok használatának elkerülésére.

1.8.4. **Ellenőrzések**

A hígítóvíz-ellenőrzések száma a vizsgálat kialakításától függ (lásd 1.7–1.7.2. szakasz). Amennyiben diszpergálószert használnak, akkor ugyanannyi ellenőrzést kell végezni, mint amennyit a hígítóvíz-ellenőrzések esetében.

1.8.5. **Az analitikai meghatározások és mérések gyakorisága**

A vizsgálat során a vizsgált anyag koncentrációját rendszeres időközönként meg kell állapítani (lásd az alábbiakban).

Átfolyási vizsgálatok esetében a hígítóvíz és a mérgező hatású törzsoldat áramlási sebességét időszakosan – lehetőleg naponta egyszer – ellenőrizni kell, továbbá biztosítani kell, hogy ezen érték a vizsgálat során 10 %-nál nagyobb mértékben ne ingadozzon. Amennyiben a vizsgált anyag koncentrációértékei a névleges értékek ± 20 százalékos sávján belülre várhatók (azaz a 80–120 %-os sávon belül; lásd 1.6.2. és 1.6.3. szakasz), akkor minimális intézkedésként javasolt a legmagasabb és a legalacsonyabb kísérleti koncentrációk elemzése a vizsgálat kezdetekor, majd azt követően hetente egyszer. Amennyiben a vizsgált anyag koncentrációértékei várhatóan nem maradnak a névleges értékek ± 20 százalékos sávján belül (a vizsgált anyag stabilitási adatai alapján), akkor javasolt az összes kísérleti koncentráció elemzése, de minden esetben ugyanazon eljárásrendnek megfelelően.

A félstatikus (megújítási) vizsgálatok esetében, ahol a vizsgált anyag koncentrációja várhatóan a névleges értékek ± 20 százalékos sávján belül marad, minimális intézkedésként javasolt a legmagasabb és a legalacsonyabb kísérleti koncentrációk elemzése a frissen elkészített közegre nézve a vizsgálatok kezdetekor, közvetlenül a megújítást megelőzően, valamint azt követően hetente egyszer. Amennyiben a vizsgált anyag koncentrációértékei várhatóan nem maradnak meg a névleges értékek ± 20 százalékos sávján belül, az összes kísérleti koncentrációt a stabilabb anyagoknál alkalmazottal azonos eljárásrendnek megfelelően kell elemezni.

▼B

Az eredményeket célszerű a ténylegesen mért koncentrációértékekre alapozni. Amennyiben azonban megfelelő bizonyítékokkal támasztható alá az, hogy az oldatban lévő vizsgált anyag koncentrációját sikerült a vizsgálatok során mindvégig a névleges értékek vagy a kiindulási koncentráció ± 20 százalékos sávján belül tartani, akkor az eredményeket a névleges vagy a mért értékekre is lehet alapozni.

Szükség lehet a minták szűrésére (0,45 mikron pórusméretű szűrőbetétet használva) vagy centrifugálására. A javasolt eljárás a centrifugálás. Amennyiben azonban a vizsgált anyag nem adszorbeálódik a filter felszínén, akkor a szűrés is elfogadható módszer.

A vizsgálat során mindegyik edényben mérni kell az oldottoxigén-koncentrációt, a pH-értéket és a hőmérsékletet. A vízkeménységet, a lúgosságot és a sótartalmat (amennyiben ez mérvadó szempont) mérni kell a kontrollmintákban és a legmagasabb koncentrációjú közeget tartalmazó egyik edényben. Minimális követelményként az oldottoxigén-koncentrációt és a sótartalmat (amennyiben ez mérvadó szempont) mérni kell három alkalommal (a vizsgálat elején, közepén és végén). A félstatikus (megújítási) vizsgálatok esetében javasolt az oldottoxigén gyakoribb mérése, lehetőleg minden vízcsere előtt és után, de hetente legalább egyszer. A pH-értéket a félstatikus megújítási vizsgálatok esetében minden vízcsere elején és végén mérni kell, az átfolyási vizsgálatok esetében pedig legalább hetente egyszer. A vízkeménységet és a lúgosságot vizsgálatonként egyszer kell megmérni. A hőmérsékletet legalább egy tesztedényben folyamatosan figyelemmel kell kísérni.

1.8.6. **Megfigyelések**

Tömegmérés: a vizsgálat végén le kell mérni az összes életben maradt hal nedves (itatóspapírral szárított) tömegét; vagy tesztedényenként csoportosan mért vagy egyedi súlyt kell meghatározni. A halak tesztedényenkénti együttes tömegmérése kedvezőbb az egyedi mérésnél, mert ez utóbbinál minden egyes halat külön meg kell jelölni. Az egyes egyedek fajlagos növekedési üteme meghatározásához végzett egyedi testtömegmérések esetében a halak egyedi jelölésére stresszmentes módszert kell kiválasztani (megfelelőek lehetnek a fagyasztásos jelölés alternatívái, például a színes, vékony horgászzsinór használata).

A halakat a vizsgálat időszakában naponta meg kell vizsgálni és bármilyen külső rendellenességet (bevérzés, elszíneződés) vagy rendellenes viselkedésmódot fel kell jegyezni. Az elpusztulásokat fel kell jegyezni, és az elpusztult egyedeket a lehető legrövidebb idő alatt el kell távolítani a tartályból. Az elpusztult halakat nem kell pótolni, mivel a meghatározott telepítési tömeg és sűrűség elegendő – a halak edényben mért számában beálló változás révén – a növekedési ütem módosulásának elkerüléséhez. A táplálék arányát azonban ki kell igazítani.

2. ADATOK ÉS JELENTÉSKÉSZÍTÉS

2.1. AZ EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE

A vizsgálat kialakításába és eredményei elemzésébe ajánlott egy statisztikus bevonása, mivel e vizsgálati módszer jelentős eltéréseknek ad teret a kísérletek menetének kialakításában, például ami a tesztkamrák, a kísérleti koncentrációk, a halak stb. számát illeti. A vizsgálat kialakításában rejlő választási lehetőségekre való tekintettel a statisztikai módszerre vonatkozó külön eligazítás itt nem szerepel.

▼B

A 10 %-ot meghaladó mortalitási arányú tesztedényekre nézve nem kell kiszámítani a növekedési ütemet. A mortalitási arányt azonban az összes kísérleti koncentrációra nézve jelezni kell.

Bármilyen módszer is szolgáljon az adatok elemzésére, a központi kérdés az „r” specifikus növekedési ütem nagysága a „t_1” és „t_2” időpont között. Ezt különböző módokon lehet meghatározni, attól függően, hogy a halakat megjelölik-e egyedileg, illetve hogy szükség van-e az átlagos növekedési ráta kiszámítására.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

ahol:

r_1 = halegyedek specifikus növekedési üteme

r_2 = specifikus növekedési ütem a tartály átlagában

r_3 = pszeudospecifikus növekedési ütem

w_1, w_2 = egy adott hal tömege, a t_1, illetve t_2 időpontban

$\log_e w_1$ = egy adott hal vizsgálati időszak elején mért tömegének logaritmusa

$\log_e w_2$ = egy adott hal vizsgálati időszak végén mért tömegének logaritmusa

$\log_e W_1$ = a tesztkamrában lévő halakra vonatkozó w1 értékek logaritmusainak átlaga a vizsgálati időszak elején

$\log_e W_2$ = a tesztkamrában lévő halakra vonatkozó w_2 értékek logaritmusainak átlaga a vizsgálati időszak végén

t_1, t_2 = a vizsgálati időszak elejének és végének ideje (napja)

Az r_1, r_2, r_3 értékeket ki lehet számítani a 0–8. nap időszakára és – adott esetben (azaz amennyiben a 14. napon is végeznek méréseket) – a 0–14., illetve a 14–28. nap időszakára.

2.1.1. **Az eredmények regressziós elemzése (a koncentráció változására való reagálás modellezése)**

Ezen elemzési módszer a specifikus növekedési ütem és a koncentrációértékek között hoz létre alkalmas matematikai összefüggést, és ennélfogva lehetővé teszi az „EC_x” azaz bármely szükséges EC érték becslését. E módszer használatakor nem szükséges kiszámítani az „r” értékét az egyes halegyedekre (r_1), hanem ehelyett az „r” „kamraátlag” értékére (r_2) lehet a számítást alapozni. Lehetőleg ez utóbbi módszert kell alkalmazni. Ez egyben a legkisebb halfajok kísérleti felhasználásához is célszerűbb megoldás.

Az átlagos specifikus növekedési ráták (r_2) a koncentráció változásának függvényében grafikusan ábrázolhatók a koncentráció változására való reagálás összefüggéseinek megvizsgálása érdekében.

▼B

Az r_2 és a koncentráció alakulása közötti összefüggés kifejezése érdekében egy megfelelő indoklással alátámasztott választás szerinti, alkalmas modellt kell használni.

Amennyiben a kísérletet túlélő halak száma nem azonos a tesztedényekben, akkor a modellillesztéses folyamatot, függetlenül attól, hogy egyszerű vagy nem lineáris, súlyozni kell, a csoportok nem egyenlő létszámának a figyelembevétele érdekében.

A modellillesztéses módszer segítségével becsülhető kell, hogy legyen pl. az EC_{20} és a középértéktől való eltérés (akár a standard hibát, akár a konfidencia-intervallumot tekintve). Az illesztett modell grafikonját az adatokkal összevetve kell bemutatni úgy, hogy látható legyen a modell illeszkedésének megfelelő volta (9) (19) (20) (21).

2.1.2. **Az eredmények elemzése a LOEC becsléséhez**

Amennyiben a vizsgálat során párhuzamos tartályokat használnak valamennyi koncentrációszinten, akkor a LOEC becslését az átlagos specifikus növekedési ráták varianciaanalízisére (ANOVA) lehet alapozni (lásd 2.1. szakasz), amit egy célszerű módszer alkalmazása követ (pl. a Dunnett- vagy a Williams-vizsgálat (13) (14) (15) (22)), amellyel az átlagos „r” értéket lehet összevetni valamennyi koncentrációszint esetében a kontrollszámítások átlagával azon legalacsonyabb koncentráció megállapítására, amelyben 0,05-ös valószínűségi szinten szignifikáns a változás. Amennyiben nem teljesülnek a paraméteres módszerre nézve megkövetelt feltételek – nem normál eloszlás (pl. Shapiro-Wilk-próba) vagy heterogén variancia (Bartlett-próba) – akkor fontolóra lehet venni az adatok varianciahomogenizálása érdekében történő transzformálását az ANOVA elemzés elvégzése előtt, illetve egy súlyozott ANOVA elemzés végrehajtását.

Amennyiben a vizsgálat során nem használnak párhuzamos tartályokat valamennyi koncentrációszinten, akkor a tartályokra alapozott ANOVA elemzés érzéketlen vagy kivitelezhetetlen lesz. Ebben a helyzetben elfogadható kompromisszumot jelent, ha az ANOVA elemzést az egyes halegyedekre vonatkozó r_3 pszeudospecifikus növekedési ütemre alapozva végzik el.

Ekkor az egyes kísérleti koncentrációkhoz tartozó átlagos r_3 értékeket össze lehet hasonlítani a kontrollokra vonatkozó átlagos r_3 értékkel. A LOEC értékét ekkor a korábbiakban említettekkel azonos módon lehet megállapítani. Fel kell ismerni, hogy e módszer nem veszi figyelembe a tartályok közötti variabilitást – és nem is nyújt védelmet ellene – azon túl, amit az egyes halegyedek közötti variabilitás alapján lehet beszámítani. A tapasztalat azonban azt mutatta (9), hogy a tartályok közötti variabilitás nagyon csekély volt a tartályon belüli (azaz egyedek közötti) variabilitáshoz képest. Amennyiben egyes halegyedeket nem vonnak be az elemzésbe, akkor a kívül eső értékek azonosítására szolgáló módszert és alkalmazásának igazolását biztosítani kell.

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Az eredményeket kellő óvatossággal kell értelmezni, amennyiben a kísérleti oldatokban mért mérgezőanyag-koncentrációk az analitikai módszer észlelési határa közelében lévő szinteket érnek el, vagy – félstatikus (megújítási) vizsgálatok esetében – amennyiben a vizsgált anyag koncentrációja csökken az oldat frissen elkészített állapota és a megújítás előtti állapota között.

2.3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálatról készített jelentésben ki kell térni az alábbi információkra:

▼B

2.3.1. **A vizsgált anyag**

— a vizsgált anyag fizikai jellege és fontos fizikai-kémiai tulajdonságai,

— a kémiai azonosítási adatok, beleértve a kémiai tisztaságot és – adott esetben – a vizsgált anyag mennyiségének számszerűsítésére szolgáló analitikai módszert.

2.3.2. **A vizsgált fajok**

— lehetőség szerint a tudományos név,

— törzs, méret, szállító, esetleges előzetes kezelés stb.

2.3.3. **Vizsgálati körülmények**

— az alkalmazott vizsgálati eljárás (pl. félstatikus/megújítási, átfolyási, telepítési tömeg és sűrűség stb.),

— a vizsgálat kialakítása (pl. a tesztedények száma, a kísérleti koncentrációk és ismétlések, a halak tartályonként létszáma),

— a törzsoldat elkészítésének módszere és a vízcsere gyakorisága (az esetleg használt diszpergálószer nevét és koncentrációját meg kell adni),

— a névleges kísérleti koncentrációk, a mért értékek átlaga és szórása a kísérleti tartályokban, az ilyen adatok megszerzésének módszerei és bizonyítékok annak alátámasztására, hogy a mérések valóban az oldatban lévő vizsgált anyag koncentrációszintjeire vonatkoznak,

— a hígítóvíz jellemzői: pH-érték, keménység, lúgosság, hőmérséklet, oldottoxigén-koncentráció, maradványklór-szintek (amennyiben mérik), összes szerves szén, szuszpendált szilárd anyagok, a vizsgálati közeg sótartalma (amennyiben mérik) és bármely más mérési adat,

— vízminőség a tesztedényekben: pH-érték, keménység, hőmérséklet és az oldottoxigén-koncentráció,

— részletes információk a tápanyagról (pl. a haltáp típusa, beszerzési forrása, az adagolt mennyiség és az adagolás gyakorisága).

2.3.4. **Eredmények**

— annak bizonyítása, hogy a kontrollok teljesítették a túlélés érvényességi kritériumait, valamint adatok a különböző kísérleti koncentrációkban bekövetkező mortalitásról,

— a felhasznált statisztikai analitikai módszerek és hogy a statisztika párhuzamos vizsgálatok eredményein vagy az egyedekre vonatkozó adatokon alapul-e, az adatok kezelése és a felhasznált módszerek célszerűségének igazolása,

— táblázatokba foglalt adatok a halak egyedi és átlagtömegéről a 0., 14. (amennyiben mérik) és a 28. napon mérve, az átlagos specifikus növekedési ráta vagy a pszeudospecifikus növekedési ráta értékei a 0–28. nap időszakában vagy lehetőség szerint a 0–14. és a 14–28. nap időszakaiban,

— a statisztikai elemzés eredményei (azaz regressziós analízis vagy ANOVA) lehetőleg táblázatos és grafikus formában bemutatva, valamint a LOEC ($p = 0,05$) és a NOEC vagy lehetőség szerint az EC_x értékei, adott esetben a szórás feltüntetésével,

▼B

— a halak szokatlan reakcióinak és a vizsgált anyag által előidézett bármely látható elváltozás előfordulása.

3. SZAKIRODALOM

(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, pp. 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, pp. 1855-1870.

(4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (Brachydanio rerio): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp.157-164.

(5) Yamamoto, Toki o. (1975). Series of stock cultures in biological fielásd Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(6) Holcombe, G. W., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (Oryzias latipes). Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, pp. 287-297.

(7) Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (Oryzias latipes). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

(8) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R. C. Bahner and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 328-338.

(9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS l/RM/28, 81 pp.

(10) Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

▼B

(14) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp. 103-117.

(15) Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, Oncorhynchus mykiss: effect of feeding level. Aquaculture 120, pp. 123-133.

(16) Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Journal of Fish Biology, 37, pp. 33-41.

(17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T. F. H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.

(18) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, pp. 1485-1494.

(19) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(20) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(21) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp. 510-531.

▼B

1. függelék

A VIZSGÁLATHOZ JAVASOLT HALFAJOK ÉS A MEGFELELŐ VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEK

Fajok	A vizsgálathoz javasolt hőmérséklet-tartomány (°C)	Megvilágítási időszak (óra)	Halak javasolt kiindulási tömege (gramm)	Megkövetelt mérési pontosság	Betelepítési tömeg (g/l)	Betelepítési sűrűség (literenként)	Táplálék	Vizsgált idő tartama (nap)
Javasolt fajok:								
Oncorhynchus mykiss Szivárványos pisztráng	12,5—16,0	12–16	1–5	Legközelebbi 100 mg	1,2—2,0	4	Lazacivadékok különleges szárított tápláléka	>28
Más, jól dokumentált fajok								
Danio rerio Zebrahal	21–25	12–16	0,050—0,100	Legközelebbi 1 mg	0,2—1,0	5–10	Élő táplálék *(Brachionus artemia)*	>28
Oryzias latipes Rizshal (Medaka)	21–25	12–16	0,050—0,100	Legközelebbi 1 mg	0,2—1,0	5–20	Élő táplálék *(Brachionus Artemia)*	>28

▼B

2. függelék

AZ ELFOGADHATÓ MINŐSÉGŰ HÍGÍTÓVÍZ NÉHÁNY FONTOSABB KÉMIAI TULAJDONSÁGA

ANYAG MEGNEVEZÉSE	KONCENTRÁCIÓ-ÉRTÉKEK
Lebegőanyag	< 20 mg/liter
Összes szerves szén	< 2 mg/liter
Nem ionizált ammónia	< 1 μg/liter
Maradek klór	< 10 μg/liter
Összes szerves foszfortartalmú peszticid	< 50 ng/liter
Összes szerves klórtartalmú peszticid pluszpoliklórozott bifenilek	< 50 ng/liter
Összes szerves klór	< 25 ng/liter

▼B

3. függelék

Toxicitási vizsgálatok céljaira alkalmas koncentrációértékek logaritmikus sorozatai (9)

Oszlop (koncentrációértékek száma 100 és 10 vagy 10 és 1 között) (*)						
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

(*) Egy oszlopból öt (vagy több) egymást követő koncentrációértéket lehet kiválasztani. Az x oszlopban szereplő koncentrációértékek közötti középértékek a (2x + 1) oszlopban találhatók meg. A felsorolt értékek mennyiség vagy tömegszázalék (mg/liter vagy mikrogramm/liter) formájában kifejezett koncentrációértékeket jelenthetnek. Az értékeket adott esetben a 10 bármely hatványával meg lehet szorozni vagy el lehet osztani. Az 1. oszlop adatai akkor használhatók, ha jelentős a bizonytalanság a toxicitás szintjét illetően.

▼B

C.15. RÖVID TÁVÚ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT HALEMBRIÓKKAL ÉS HALLÁRVÁKKAL

1. MÓDSZER

E rövid távú toxicitásvizsgálati módszer az OECD TG 212 (1998) megfelelője.

1.1. BEVEZETÉS

A halembriókon és hallárvákon végzett rövid távú toxicitásvizsgálat olyan rövid távú vizsgálat, amely az újonnan megtermékenyült petétől a szikzacskós ivadéki állapot végéig terjedő fejlődési szakaszokat fedi le. Az embrió- és lárvateszt során táplálék adagolására nem kerül sor, és ezért a vizsgálatot addig kell befejezni, amíg az ivadékokat még táplálja a saját szikzacskójuk.

A vizsgálata célja meghatározni a vizsgált fajokra és azok fejlődési szakaszaira vegyi anyagok által gyakorolt letális és – korlátozott mértékig – a szubletális hatásokat. E vizsgálat hasznos információkkal szolgálhat, amennyiben a) hidat képez a letális és szubletális vizsgálatok között; b) elővizsgálatként alkalmazható a korai életciklusra vonatkozó valamennyi vagy krónikus toxicitási vizsgálatok esetében; és c) olyan fajok vizsgálatára is felhasználható, amelyek tenyésztési módszerei nem kellően fejlettek ahhoz, hogy lefedjék az endogén táplálkozásról az exogén jellegűre való váltás időszakát.

Emlékeztetni kell arra, hogy csak a halak életciklusának minden szakaszát felölelő vizsgálatok képesek általában pontos becslést adni a vegyi anyagok halakra gyakorolt krónikus toxicitásáról, továbbá hogy az egyes életszakaszokban alkalmazott csökkentett expozíció csökkentheti a teszt érzékenységét, s ezért a krónikus toxicitás mértékének alábecsléséhez vezethet. Ezért várható, hogy a halembriókon és hallárvákon végzett toxicitási vizsgálat kevésbé lesz érzékeny, mint a halak korai életciklusát vizsgáló valamennyi vizsgálat, különösen ami a lipofil (log P_{ow} > 4), illetve a mérgező hatásukat sajátságos módon kifejtő vegyi anyagokat illeti. A kétféle vizsgálat között az érzékenység tekintetében mutatkozó kisebb különbségek a nem specifikus, narkotikus hatásmechanizmusú vegyi anyagok esetében várhatók (1).

E vizsgálat publikálását megelőzően a halembriók és hallárvák körében a legtöbb tapasztalatot az édesvízi *Danio rerio* Hamilton-Buchanan nevű hallal (Teleostei, Cyprinidae, közönséges nevén zebrahal) szerezték. Ezért a vizsgálatnak az e fajra vonatkozó végrehajtásáról az 1. függelék részletes útmutatást nyújt. Ez természetesen nem zárja ki olyan más fajok használatát, amelyekre nézve szintén ismertek tapasztalatok (lásd az IA. és IB. táblázatot).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Legalacsonyabb megfigyelhető hatást okozó koncentráció (LOEC): a vizsgált anyag azon legalacsonyabb kísérleti koncentrációja, amelynél a kontrollal összevetve még megfigyelhető az anyag egy jelentős hatása ($p < 0,05$). Azonban a LOEC fölötti koncentrációnak olyan ártalmas hatást kell kifejtenie, amely legalább azonos a LOEC-nél megfigyelttel, vagy súlyosabb annál.

Megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC): a közvetlenül a LOEC alatti kísérleti koncentráció.

▼B

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A halembriók és hallárvák a vízben oldott vizsgált anyag széles tartományon belüli koncentrációinak vannak kitéve. A tervezés során választani lehet a félstatikus és az átfolyási eljárás közül. A választást a vizsgált anyag jellege határozza meg. A vizsgálat azzal kezdődik, hogy frissen megtermékenyített petéket helyeznek a kísérleti kamrákba, és akkor ér véget, amikor a kísérleti kamrák valamelyikében bármelyik lárva szikzacskója teljesen felszívódik, vagy amennyiben elkezdődik a kontrollcsoportokban az éhezés miatti pusztulás. A letális és szubletális hatásokat ki kell értékelni, és össze kell hasonlítani a kontrollcsoportbeli értékekkel, a legalacsonyabb megfigyelhető hatást okozó koncentráció (LOEC), és ennek kapcsán a megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) meghatározása érdekében. Alternatív módon a hatásokat egy regressziós modellel lehet elemezni azon koncentráció megállapítása érdekében, amely egy adott százaléknyi hatást vált ki (azaz LC/EC_x, C/EC_x, ahol az x egy meghatározott százalék mértékű hatás).

1.4. A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

Rendelkezésre kell hogy álljanak az e vizsgálat céljára kiválasztott fajokkal lehetőleg korábban már végzett, akut toxicitási vizsgálatok eredményei (lásd a C.1. vizsgálati módszert). Az eredmények hasznosak lehetnek a korai életszakaszokat vizsgáló vizsgálat során alkalmazandó kísérleti koncentrációk megfelelő tartományának kiválasztásában. Ismerni kell a vizsgált anyag vízoldhatóságának (ideértve a vizsgálathoz felhasznált vizet is) és gőznyomásának értékeit. Megbízható analitikai módszerrel kell rendelkezni a kísérleti oldatokban lévő vizsgált anyag számszerűsítésére, amelynek pontossága és észlelésének korlátai ismertek és dokumentáltak.

A vizsgálati körülmények megállapítása tekintetében hasznos információk közé tartozik még a szerkezeti képlet, az anyag tisztasága, stabilitása fénnyel, illetve a vizsgálat körülményeivel szemben, a pKa és P_{ow} értékek, valamint a gyors biológiai lebomlásra vonatkozó vizsgálatok eredményei (lásd a C.4. vizsgálati módszert).

1.5. A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

A vizsgálat érvényességéhez az alábbi feltételeknek kell teljesülniük:

— a kontrollcsoportokban és – amennyiben szükséges – az oldószeres kontrollokban a megtermékenyített peték összesített túlélési arányszámai nagyobbak a 2. és 3. függelékben meghatározott határértékeknél vagy egyenlők azokkal,

— a kísérlet során az oldott oxigén koncentrációját mindvégig legalább a levegő telítettségi érték (ASV) 60 és 100 %-a között kell tartani,

— a víz hőmérséklete a vizsgálat során a tesztedényekben, illetve bármelyik két egymást követő nap között 1,5°C-nál nagyobb mértékben nem változhat, és a hőmérsékletet a vizsgált fajra nézve meghatározott hőmérséklet-tartományon belül kell tartani (lásd 2. és 3. függelék).

▼B

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Tesztedények**

Üvegből vagy más, kémiailag semleges anyagból készült edényeket kell használni. Az edényeknek elég nagyoknak kell lenniük ahhoz, hogy lehetővé tegyék a betelepítési arány betartását (lásd 1.7.1.2. szakasz). Javasolt a tesztedények véletlenszerű elhelyezése a vizsgálatra kijelölt területen. A teljesen véletlenszerű elrendezéssel szemben célszerűbb a véletlenszerűen elhelyezett blokkok alkalmazása, ahol mindegyik blokkban képviselve van mindegyik kezelési mód, amennyiben léteznek a blokkelrendezés révén ellenőrizhető, szisztematikusan érvényesülő hatások a laboratóriumban. Amennyiben ilyen blokkokba rendezésre kerül sor, akkor ennek tényét az adatok későbbi elemzései során figyelembe kell venni. A tesztedényeket védeni kell a nem kívánt zavaró hatásoktól.

1.6.2. **A halfajok kiválasztása**

A vizsgálat céljaira javasolt halfajok listáját az 1A. táblázat tartalmazza. Ez nem zárja ki más fajok használatát (amelyre példák az 1B. táblázatban találhatók), de az eljárást ekkor esetleg módosítani kell a megfelelő feltételek biztosítása érdekében. Ebben az esetben a jelentésnek tartalmaznia kell a fajok és a kísérleti módszer kiválasztásának indoklását.

1.6.3. **A halivadék tartása**

A halivadék megfelelő feltételek melletti tartására vonatkozó részletek az OECD TG 210 jelű dokumentumban ([1]) és a (2) (3) (4) (5) (6) számú szakirodalmi hivatkozásban találhatók.

1.6.4. **Az embriók és lárvák kezelése**

Az embriókat és lárvákat a fő tartályon belül elhelyezett, oldalaiknál vagy végeiknél lukacsos kisebb edényekben lehet kitenni a tartályon átfolyó vizsgált oldat hatásának. E kisebb tartályokban a turbulenciamentes áramlást úgy lehet elérni, hogy az edényeket egy olyan karra függesztjük fel, amely fel-le mozgatható, ügyelve, hogy az organizmusok mindig a vizsgált oldatban legyenek; egy szifonzáras öblítőrendszert is be lehet építeni. Lazacfélék megtermékenyített petéit olyan rácsokon vagy hálókon lehet tartani, amelyek nyílásai elég nagyok ahhoz, hogy a petékből kibújó lárvák átessenek rajtuk. A teljes napi megújítással járó félstatikus vizsgálatok során Pasteur-pipettákat lehet használni az embriók és lárvák kiemelésére (lásd 1.6.6. szakasz).

Amennyiben a peték fő kísérleti tartályon belüli tartására kis tartályokat, rácsokat vagy hálókat használnak, akkor a lárvák kikelése után ezeket a visszatartó eszközöket el kell távolítani ([1]), kivéve, ha a halak szökésének megakadályozása érdekében van rájuk szükség. Amennyiben szükség lenne a lárvák áthelyezésére, akkor azokat nem szabad kitenni a levegő hatásának, és nem szabad hálót használni halaknak a peték tárolására használt tartályból való kiemelésére (ilyen elővigyázatosságra nincs feltétlenül szükség egyes kevésbé sérülékeny halfajok, pl. ponty esetén). Az ilyen áthelyezés időzítése az egyes fajoktól függően változik, és nincs mindig szükség rá. A félstatikus módszernél főzőpoharakat vagy alacsony falú edényeket lehet használni, és – amennyiben szükséges – ezeket a főzőpohár alja fölé kismértékben emelt hálóval lehet felszerelni. Amennyiben az ilyen tartóedények térfogata megfelelő a betelepítési szinttel kapcsolatos követelmények teljesítéséhez (lásd 1.7.1.2. szakasz), akkor nincs is feltétlenül szükség az embriók vagy lárvák áthelyezésére.

([1]) OECD, Párizs, 1992, Test Guideline 210, „Fish, Early-life Stage Toxicity Test”.

▼B

1.6.5. **Víz**

A vizsgálathoz bármely olyan víz felhasználható, amely megfelel a 4. függelékben az elfogadható minőségű hígítóvízre vonatkozó kémiai jellemzőknek, és amelyben a vizsgálatnak alávetett állatfajok legalább olyan jó túlélési eredményeket mutatnak, mint ami a 2. és 3. függelékben le van írva. A víz minőségét a kísérlet során mindvégig azonos szinten kell tartani. A víz pH-értéke az adott vizsgálat során mindvégig csak ± 0,5 pH-egységgel térhet el a kiindulási értéktől. Annak biztosítására, hogy a hígítóvíz ne gyakoroljon nem kívánt hatást a vizsgálat eredményeire (pl. mert komplexet képez a tesztanyaggal), illetve ne gyakoroljon kedvezőtlen hatásokat az ivadékállomány teljesítményére, időnként mintákat kell venni elemzésre. Mérni kell a következő összetevőket: a nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd és Ni), a fontosabb anionok és kationok (pl. Ca, Mg, Na, K, Cl és SO_4), a peszticidek (pl. összes szervesfoszfor- és összes szervesklór-tartalmú peszticid), az összes szerves szén és a szuszpendált szilárd anyagok koncentrációját, például háromhavonta, amennyiben a hígítóvízről tudott, hogy viszonylag állandó minőségű. Amennyiben a víz minősége bizonyítottan konstans legalább egy éven keresztül, akkor ritkábban, nagyobb időközökkel is lehet ellenőrző méréseket végezni (pl. csak hathavonta egyszer).

1.6.6. **Vizsgált oldatok**

A kiválasztott koncentrációjú vizsgált oldatok a törzsoldat hígításával készíthetők el.

A törzsoldatot lehetőleg a vizsgált anyagnak a hígítóvízbe, mechanikai eszközök (pl. keverő, ultrahang) segítségével történő bekeverésével vagy hozzákeverésével kell elkészíteni. Telítési oszlopok (oldhatósági oszlopok) is felhasználhatók a megfelelő koncentrációjú törzsoldat elkészítéséhez. A lehetőségekhez mérten kerülni kell az oldószerek vagy diszpergálószerek használatát, bár ilyen vegyületekre egyes esetekben szükség lehet egy megfelelő töménységű törzsoldat előállításához. Alkalmas oldószer lehet az aceton, etanol, metanol, dimetil-formamid és a trietilén-glikol. Alkalmas diszpergálószer lehet például: a Cremophor RH40, Tween 80, Metilcellulóz 0,01 % és a HCO-40. Kellő figyelemmel kell eljárni a biológiailag gyorsan lebomló szerek (pl. aceton) és/vagy az erősen illékony összetevők használatakor, mivel ezek az átfolyási vizsgálatok során fellépő bakteriális szintetikus aktivitás miatt okozhatnak gondokat. Amennyiben diszpergálószereket kell használni, azok nem gyakorolhatnak lényeges hatásokat a túlélésre, és láthatóan kedvezőtlen hatásokat a korai életszakaszban, amit csak egy oldószerrel végzett ellenőrző vizsgálat tárhat fel. Törekedni kell azonban az ilyen anyagok használatának kerülésére.

Félstatikus vizsgálatok során két különböző vízcseremódszer közül lehet választani: i. új vizsgált oldatokat készítenek tiszta edényekben és a kísérlet korábbi fázisait túlélő petéket és lárvákat a régi oldat kis mennyiségével együtt kíméletesen áttelepítik az új edényekbe, kerülve az élőlények érintkezését a levegővel; vagy ii. az organizmusokat visszatartják az edényben, miközben a vizsgálat céljaira használt víz egy részét (legalább háromnegyedét) lecserélik. A közeg megújításának gyakorisága a vizsgált anyag stabilitásától függ, azonban ajánlott a víz napi cseréje. Amennyiben a korábbi stabilitási vizsgálatok (lásd 1.4. szakasz) arra mutattak rá, hogy nem stabil a vizsgált anyag koncentrációja (azaz kívül esik a névleges koncentráció 80–120 %-os tartományán, vagy a kiinduláskor mért koncentráció 80 %-a alá csökken) a megújítási időszak során, akkor fontolóra kell venni egy átfolyási vizsgálat lefolytatását. Minden esetben gondosan ügyelni kell arra, hogy elkerüljük a lárvákat érő stresszhatásokat a vízcsereműveletek során.

▼B

Az átfolyási vizsgálatok céljára olyan rendszert kell használni, amely folyamatosan biztosítja és hígítja a vizsgált anyag törzsoldatát (pl. egy adagolószivattyú, proporcionális hígító vagy egy telítőrendszer), annak érdekében, hogy a kísérleti kamrákhoz eljusson a hígítóoldat. A kísérlet során megfelelő időnként – lehetőleg naponta – ellenőrizni kell a törzsoldatok és a hígítóvíz áramlási sebességét, amelynek értéke nem változhat 10 %-nál nagyobb mértékben a vizsgálat során. A 24 óránként legalább öt kísérleti kamrányi vízcserének megfelelő áramlási sebességet találták megfelelőnek.

1.7 ELJÁRÁS

A szakirodalom hasznos információkat tartalmaz a halembriók és hallárvák toxicitási vizsgálatai során mutatott teljesítményéről, amelyek közül néhányat példaként e szövegrész szakirodalmi hivatkozásai tartalmaznak (7) (8) (9).

1.7.1. **Expozíciós feltételek**

1.7.1.1. *Időtartam*

A vizsgálatot lehetőleg a peték megtermékenyítését követő 30 percen belül meg kell kezdeni. Az embriókat a csírakorong osztódásának kezdete előtt, vagy közvetlenül utána, vagy bármely időpontban, mielőtt a gasztrulastádium kialakulna, a tesztoldatba kell helyezni. A kereskedelmi szállítótól kapott peték esetében nincs mód a vizsgálat azonnali megkezdésére a megtermékenyítés után. Mivel a kezdés késleltetése komolyan befolyásolja a vizsgálat érzékenységét, a vizsgálatot a megtermékenyítést követő nyolc órán belül mindenképpen el kell kezdeni. Mivel az expozíciós idő alatt a lárvák nem kapnak táplálékot, a vizsgálatot még az előtt be kell fejezni, mielőtt a kísérleti kamrák valamelyikében bármelyik lárva szikzacskója teljesen felszívódik, vagy elkezdődik a kontrollcsoportokban az éhezés miatti pusztulás. Az időtartam a használt fajtól függ. Néhány javasolt időtartam a 2. és 3. függelékben található.

1.7.1.2. *Betelepítés*

A vizsgálat kezdetén használt megtermékenyített peték számának elegendőnek kell lennie a statisztikai követelmények kielégítéséhez. A petéket véletlenszerűen kell elosztani a különböző kezelési módok között, és koncentrációszintenként legalább három párhuzamos edény között egyenletesen elosztott, tartályonként legalább 30 megtermékenyített petét kell behelyezni (illetve törekedni kell a lehető legegyenletesebb elosztásra, mert egyes fajok esetében nehéz a teljesen egyenlő adagok kimérése). A betelepítési arányt (a vizsgált oldat egységnyi mennyiségére jutó biomassza) mindenképpen annyira alacsonyan kell tartani, hogy a vízben oldott oxigén koncentrációját külön levegőztetés nélkül is a levegőtelítettségi érték legalább 60 %-ának megfelelő szinten lehessen tartani. Az átfolyási vizsgálatok esetében javasolt a 24 órára számítottan 0,5 g/liternél, illetve bármely időpontban 5 g/liter oldatnál nem magasabb betelepítési arány tartása (2).

1.7.1.3. *Megvilágítás és hőmérséklet*

A megvilágítási időszakokat és a víz hőmérsékletét a vizsgált halfajok sajátosságaihoz kell igazítani (lásd 2. és 3. függelék). A hőmérséklet alakulásának figyelemmel kíséréséhez célszerű lehet egy további tesztedény beiktatása.

▼B

1.7.2. **Vizsgálati koncentrációk**

A vizsgált anyagból általában ötféle, egy 3.2 értékű konstans tényezőt meg nem haladó osztások szerint beállított koncentráció használata szükséges. A tényleges vizsgálatok során a kísérleti koncentrációk tartományának kiválasztásakor célszerű mérlegelni az LC50-et az expozíciós időszakhoz viszonyító görbét. Egyes esetekben célszerű lehet az ötnél kevesebb koncentrációszint alkalmazása (pl. a határérték-vizsgálatoknál), valamint a szűkebb koncentráció-intervallumok használata. Az ötnél kevesebb koncentrációszint alkalmazását indokolni kell. Nem szükséges vizsgálni a vizsgált anyag koncentrációját a 96 óránál LC50-nél vagy a 100 mg/l értéknél magasabb értékek esetében aszerint, hogy melyik érték az alacsonyabb. A vizsgált anyagokat a vizsgálathoz használt vízben való oldhatóságuk határértéke feletti tartományban nem kell vizsgálni.

Amennyiben diszpergálószert használnak a vizsgált oldat elkészítéséhez (lásd 1.6.6. szakasz), az oldat végső koncentrációja nem lehet több, mint 0,1 ml/liter, és azonosnak kell lennie az összes vizsgálati edényben.

1.7.3. **Ellenőrzések**

A normál vizsgált sorozatokon kívül egy hígítóvíz-kontrolltartályt (szükség szerint két példányban) és – amennyiben célszerű – egy, a diszpergálószert tartalmazó kontrolltartályt kell működtetni.

1.7.4. **Az analitikai meghatározások és mérések gyakorisága**

A vizsgálat során a vizsgált anyag koncentrációját rendszeres időközönként meg kell állapítani.

A félstatikus vizsgálatok során, amennyiben a vizsgált anyag koncentrációértékei a névleges értékek ± 20 százalékos sávján belülre várhatók (azaz a 80–120 %-os sávon belül; lásd 1.4. és 1.6.6. szakasz), akkor minimális intézkedésként javasolt a legmagasabb és a legalacsonyabb kísérleti koncentrációk elemzése, a frissen készült anyagon és közvetlenül a vízcsere előtt legalább három, a vizsgálat során időben egyenletesen elosztott alkalommal (azaz az elemzéseket az azonos oldatból vett mintán kell végezni, amikor az oldat frissen készült és a megújítás alkalmával).

Amennyiben a vizsgált anyag koncentrációértékei várhatóan nem maradnak a névleges értékek ± 20 százalékos sávján belül (a vizsgált anyag stabilitási adatai alapján), akkor javasolt az összes koncentráció elemzése ugyanazon eljárásrendnek megfelelően (legalább három, a vizsgálat során időben egyenletesen elosztott alkalommal). A vizsgált anyag koncentrációértékeinek a vízcserét megelőző meghatározását minden egyes kísérleti koncentráció esetében csak egyetlen párhuzamos tartályra nézve kell elvégezni. A meghatározások között legfeljebb hét nap telhet el. Az eredményeket célszerű a ténylegesen mért koncentrációértékekre alapozni. Amennyiben azonban megfelelő bizonyítékokkal támasztható alá, hogy az oldatban lévő vizsgált anyag koncentrációját sikerül a vizsgálatok során mindvégig a névleges értékek vagy a kiindulási koncentráció ± 20 százalékos sávján belül tartani, akkor az eredményeket a névleges vagy a mért kezdeti értékekre is lehet alapozni.

Az átfolyási vizsgálat esetében megfelelő lehet a félstatikus vizsgálatokkal kapcsolatban leírthoz hasonló mintavételi eljárás alkalmazása (azonban a „régi” oldatok mérése ebben az esetben nem alkalmazható). Amennyiben azonban a vizsgálat időtartama több mint hét nap, tanácsos a mintavételek számát az első héten növelni (pl. három méréssorozatra), a koncentrációértékek stabilan tartásának biztosítása érdekében.

▼B

Szükség lehet a minták centrifugálására vagy szűrésére (0,45 mikron pórusméretű szűrőbetétet használva). Mivel a centrifugálás és a szűrés sem képes mindenkor arra, hogy szétválassza a vizsgált anyag biológiailag nem használható részét a biológiailag használhatótól, a mintákat nem feltétlenül szükséges ilyen kezeléseknek alávetni.

A vizsgálat során valamennyi kísérleti tartályban mérni kell az oldottoxigén-koncentrációt, a pH-értéket és a hőmérsékletet. A vízkeménységet, a lúgosságot és a sótartalmat (amennyiben ez mérvadó szempont) mérni kell a kontrollmintákban és a legmagasabb koncentrációjú közeget tartalmazó egyik edényben. Minimális követelményként az oldottoxigén-koncentrációt és a sótartalmat (amennyiben ez mérvadó szempont) három alkalommal kell mérni (a vizsgálat elején, közepén és végén). A félstatikus vizsgálatok esetében javasolt az oldott oxigén gyakoribb mérése, lehetőleg minden vízcsere előtt és után, de hetente legalább egyszer. A pH-értéket a félstatikus vizsgálatok esetében minden vízcsere elején és végén mérni kell, az átfolyási vizsgálatok esetében pedig legalább hetente egyszer. A keménységet vizsgálatonként egyszer kell megmérni. A hőmérsékletet naponta mérni kell, és változásait lehetőleg legalább egy vizsgálati edényben folyamatosan figyelemmel kell kísérni.

1.7.5. **Megfigyelések**

1.7.5.1. *Az embrionális fejlődés fázisa*

A vizsgált anyag hatásának való expozíció kezdetén az embrionális (gasztrula) fejlődési fázis azonosítását a lehető legpontosabban kell elvégezni. Erre a megfelelően tartósított és megtisztított peték egy reprezentatív mintája használható. Az embrionális fázisok leírását és illusztrációját illetően még a szakirodalom is felhasználható (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. *A peték kikelése és túlélése*

A kikelés és túlélés folyamatait naponta egyszer meg kell figyelni és a tapasztalt számadatokat fel kell jegyezni. A vizsgálat elején hasznos lehet az ennél gyakoribb megfigyelések végzése (pl. az első három órában félóránként), mivel egyes esetekben a túlélési idők hossza fontosabb lehet az elhullások számánál (pl. amennyiben akut toxikus hatások figyelhetők meg). Az elpusztult embriókat és lárvákat észlelésükkor azonnal el kell távolítani, mert gyorsan bomlásnak indulnak. Az elhullott egyedek kiemelésekor különös gonddal kell kerülni a szomszédos embriók/lárvák megütését, vagy fizikai megsértését, mivel e szervezetek igen sérülékenyek és érzékenyek. Az elhullás kritériumai az életciklus szakaszától függően változnak:

— **peték**: különösen a korai szakaszokban az áttetszőség jelentős csökkenése és színbeli elváltozás, amit a fehérjék koagulációja és/vagy kicsapódása okoz, ami fehér opálos színt eredményez,

— **embriók**: a testmozgás és/vagy szívverés hiánya, és/vagy opálos elszíneződés olyan fajoknál, amelyek embriói normál körülmények között áttetszők,

— **lárvák**: mozdulatlanság és/vagy légzőmozgások és/vagy a szívverés hiánya, és/vagy a központi idegrendszer opálos elszíneződése és/vagy reakció elmaradása fizikai ingerekre.

▼B

1.7.5.3. *Rendellenes küllem*

A vizsgálat időtartamától és a leírt rendellenesség jellegétől függően megfelelő időközönként fel kell jegyezni a rendellenes testformájú és/vagy pigmentációjú lárvák számát, illetve a szikzacskó felszívódásának mértékét. Meg kell jegyezni, hogy rendellenesen fejlődött embriók és lárvák természetes körülmények között is előfordulnak, és egyes fajok esetében a kontrollcsoportban mennyiségük akár néhány százalékot is elérhet. A rendellenesen fejlődött állatokat csak elpusztulásukkor kell a kísérleti edényből eltávolítani.

1.7.5.4. *Rendellenes viselkedés*

A rendellenes viselkedésmódokat – pl. hiperventilláció, koordinálatlan úszásmód és a fajra nem jellemző nyugalom – a vizsgálat teljes időtartamától függő időközönként fel kell jegyezni. Bár e hatásokat nehéz számszerűsíteni, de amennyiben megfigyelhetők, akkor segíthetnek a mortalitási adatok értelmezésében, azaz információkkal szolgálnak az anyag toxikus hatásmechanizmusáról.

1.7.5.5. *Hosszúság*

A vizsgálat végén ajánlott az egyedi hosszúságok megmérése: szabványos, villás elágazású vagy teljes hosszúságot lehet mérni. Amennyiben azonban a farokuszonyon rothadás vagy kimaródás, pusztulás jelei fordulnak elő, akkor a szabványos hosszakat kell használni. Általánosságban, egy jól végrehajtott vizsgálatban a párhuzamos kontrollok között előforduló hosszúságeltérések együtthatója < 20 % kell hogy legyen.

1.7.5.6. *A lárvák tömege*

A vizsgálat végén le lehet mérni az egyedek tömegét is; a száraztömeg-adatok (24 órán át 60 ^{o}C-on tartva) célszerűbbek az (itatóspapírral szárított) nedvestömeg-meghatározásnál. Általánosságban, egy jól végrehajtott vizsgálatban a párhuzamos kontrollok között előforduló súlyeltérések együtthatója < 20 % kell hogy legyen.

E megfigyelések eredménye az alábbi adatok némelyike vagy mindegyike, amelyek a statisztikai elemzések céljára rendelkezésre állnak majd:

— kumulált mortalitás,

— az egészséges lárvák száma a vizsgálat végén,

— a kikelés kezdetéig és végéig eltelt idő (azaz 90 %-os kikelés minden ismétlésben),

— a napi lárvakikelések száma,

— a vizsgálat végén túlélő állatok hosszúsága (és tömege),

— a deformált vagy rendellenes küllemű lárvák száma,

— a rendellenes viselkedésmódot mutató lárvák száma.

▼B

2. **ADATOK ÉS JELENTÉSKÉSZÍTÉS**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

A vizsgálat kialakításába és eredményei elemzésébe ajánlott egy statisztikus bevonása, mivel e vizsgálati módszer jelentős eltéréseknek ad teret a kísérletek menetének kialakításában, például ami a tesztkamrák, a kísérleti koncentrációk számát vagy a megtermékenyített peték induláskori számát és a mért paraméterek eltéréseit illeti. A vizsgálat kialakításában rejlő választási lehetőségekre tekintettel, a statisztikai módszerre vonatkozó külön eligazítás itt nem szerepel.

A LOEC és NOEC értékeinek becsléséhez szükséges a párhuzamos eredmények közti eltérések analízise (ANOVA) vagy a kontingenciatáblázatos módszerek alkalmazása. Az egyedi koncentrációszintek és a kontrollcsoport szintjei esetében kapott eredmények közötti összetett összehasonlítás érdekében hasznosnak bizonyulhat a Dunnett-módszer (12) (13). További hasznos példák is rendelkezésre állnak (14) (15). Ki kell számolni és jegyzőkönyvezni kell az ANOVA vagy más eljárások használatával feltárható hatások (azaz a vizsgálat teljesítőképességének) mértékét. Megjegyzendő, hogy nem minden, az 1.7.5.6. szakaszban felsorolt megfigyelés alkalmas az ANOVA használatával történő statisztikai elemzés céljaira. így például a kumulált mortalitást és a vizsgálat végén talált egészséges lárvák számát a probit módszerek használatával lehet elemezni.

Amennyiben az LC/EC_x értékeket kell megbecsülni, akkor megfelelő – pl. logisztikai – görbé(ke)t kell a vizsgált adatokhoz illeszteni olyan statisztikai módszerek használatával, mint amilyen a legkisebb négyzetek módszere vagy a nem lineáris legkisebb négyzetek módszere. A görbé(ke)t úgy kell paraméterezni, hogy az érdeklődésre számot tartó LC/EC_x értéket és annak standard hibáját közvetlenül lehessen megbecsülni. Ez nagymértékben megkönnyíti az LC/EC_x körüli konfidencia-határértékek kiszámítását. Kivéve, ha nyomós érvek szólnak a különböző konfidenciaszintek alkalmazása mellett, akkor kétoldali 95 %-os konfidenciaszintet célszerű meghatározni. Az illesztési eljárásnak lehetőleg eszközként kell szolgálnia az illeszkedés hiánya jelentőségének felmérésére. A görbék illesztésére grafikus módszerek is felhasználhatók. A regressziós elemzés az 1.7.5.6. szakaszban felsorolt összes megfigyelés elemzésére megfelelő.

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Az eredményeket kellő óvatossággal kell értelmezni, amennyiben a kísérleti oldatokban mért mérgezőanyag-koncentrációk az analitikai módszer észlelési határához közel lévő szinteket érnek el. A vizsgált anyag vízoldhatóságát meghaladó koncentrációértékekre vonatkozó eredmények értelmezésekor kellő óvatossággal kell eljárni.

2.3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

2.3.1. **A vizsgált anyag**

— a vizsgált anyag fizikai jellege és fizikai-kémiai tulajdonságai,

— a kémiai azonosítási adatok, beleértve a kémiai tisztaságot és – adott esetben – a vizsgált anyag mennyiségének számszerűsítésére szolgáló analitikai módszer.

▼B

2.3.2. **A vizsgált fajok**

— tudományos név, törzs, az ikrás nőstények száma (azaz hány nőstényt használtak a kísérlethez szükséges peteszám előállításához), szállító, valamint a megtermékenyített peték begyűjtésének módszere és az ezt követő kezelése.

2.3.3. **Vizsgálati körülmények**

— az alkalmazott vizsgálati eljárás/módszer (pl. félstatikus vagy átfolyási, a megtermékenyítéstől a vizsgálat elkezdéséig eltelt idő, betelepítés stb.),

— megvilágítási periódus(ok),

— a vizsgálat kialakítása (pl. a tesztedények és párhuzamosok száma, az embriók létszáma a párhuzamos edényekben),

— a törzsoldat elkészítésének módszere és a vízcsere gyakorisága (az esetleg használt diszpergálószer nevét és koncentrációját meg kell adni),

— a névleges kísérleti koncentrációk, a mért értékek és azok átlaga és szórása a tesztedényekben, az ilyen adatok megszerzésének módszerei és – amennyiben a vizsgált anyag vízben oldható a vizsgált koncentrációértékek szintje alatt is – bizonyítékok annak alátámasztására, hogy a mérések valóban az oldatban lévő vizsgált anyag koncentrációszintjeire vonatkoznak,

— a hígítóvíz jellemzői: pH-érték, keménység, hőmérséklet, oldottoxigén-koncentráció, maradványklórszintek (amennyiben mérik), összes szervesszén-tartalom, szuszpendált szilárd anyagok, a vizsgált közeg sótartalma (amennyiben mérik) és bármely más mérési adat,

— vízminőség a tesztedényekben: pH-érték, keménység, hőmérséklet és az oldottoxigén-koncentráció.

2.3.4. **Eredmények:**

— a vizsgált anyag stabilitására vonatkozó előzetes vizsgálatok eredményei,

— annak bizonyítása, hogy a kontrollok megfelelnek a vizsgált fajok teljes túlélési elfogadhatósági normáinak (lásd 2. és 3. függelék),

— adatok az embrió és lárva fejlődési fázisok mortalitási/túlélési arányairól és az összesített mortalitási/túlélési arányokról,

— a kikelésig eltelt napok és a kikelt példányok száma,

— hossz-(és tömeg-) adatok,

— az esetleges morfológiai rendellességek előfordulása és jellemzése,

— az esetleges viselkedésbeli eltérések előfordulása és leírása,

— az adatok statisztikai elemzése és kezelése,

— az ANOVA segítségével elemzett vizsgálatokra nézve a legalacsonyabb megfigyelhető hatást okozó koncentráció (LOEC) értéke p = 0,05-nél és megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) értéke minden egyes kiértékelt reakcióra nézve, beleértve a felhasznált statisztikai módszer leírását és annak jelzését, hogy milyen mértékű hatást sikerült feltárni,

▼B

— a regressziós analízissel elemzett vizsgálatok esetében az LC/EC_x értéke, a konfidencia-intervallumok és a számításhoz felhasznált illesztettmodell grafikonja,

— a leírt vizsgálati módszertől tett esetleges eltérések magyarázata.

3. **SZAKIRODALOM**

(1) KRISTENSEN P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121-173.

(6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (Brachydanio rerio) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61-71.

(8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (Salmo gairdneri). J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J. G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS l/RM/28, December 1992, 81 pp.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, Brachydanio reri o. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, pp. 126-134.

(18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (Danio rerio), a model system in developmental biology – an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: pp. 231-236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C, Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, pp. 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, Oryzias latipes. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (Oryzias latipes). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (Pimephales promelas) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, pp. 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

(25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

1. A. táblázat

A vizsgálatokhoz ajánlott halfajok

Édesvízi halak
Oncorhynchus mykiss Szivárványos pisztráng (9) (16)
Danio rerio Zebrahal (7) (17) (18)
Cvprinus caprio Közönséges ponty (8) (19)
Oryzias latipes Japán rizshal/Medaka (20) (21)
Pimephales promelas Nagyfejű cselle (8) (22)

▼B

1. B. táblázat

Példák más, jól dokumentált és tesztelésre használható halfajokra

ÉDESVÍZI	TENGERI
Carassius auratus Ezüstkárász (8)	*Menidia peninsulae* Tidewater silverside (nincs magyar neve) (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus Nagy naphal (8)	*Clupea harengus* Hering (24) (25)
	Gadus morhua Tőkehal (24) (25)
	Cyprinodon variegatus Tarka fogasponty (23) (24) (25)

▼B

1. függelék

ÚTMUTATÓ ZEBRAHAL- *(BRACHYDANIO RERIO)* EMBRIÓK ÉS SZIKZACSKÓS LÁRVÁK TOXICITÁSI VIZSGÁLATÁNAK VÉGREHAJTÁSÁHOZ

BEVEZETÉS

A zebrahalak India keleti, koromandel partján, gyorsfolyású patakokban élnek. A pontyfélék családjához tartozó közönséges akváriumi halak, amelyek tartásával és életkörülményeivel kapcsolatos információk bármelyik, a trópusi halakkal foglalkozó szakkönyvben megtalálhatók. Biológiájukat és alkalmazásukat a halászati kutatásban Laale ismertette.

A zebrahal csak ritkán hosszabb 45 mm-nél. Hengeres testét 7–9 fémes-sötétkék vízszintes, ezüstösen csillogó csík díszíti. E mintázat a farokúszón és a farok alatti úszón folytatódik. A hal háta sárgászöld színű. A hímek karcsúbbak a nőstényeknél. A nőstények ezüstösebbek és hasuknál duzzadtabbak, különösen ívás előtt.

A felnőtt halak a víz hőmérséklete, pH-értéke és keménységi foka tekintetében jelentős ingadozásokat képesek elviselni. Az egészséges, jó minőségű ikrákat rakó halak tartásához azonban optimális körülményeket kell biztosítani.

A szaporodási időszakban a hím üldözi és fejével bökdösi a nőstényt, és a kipréselődött ikrákat azonnal meg is termékenyíti. Az átlátszó és nem tapadós ikrák a vízfenékre hullanak alá, ahol szüleik olykor meg is eszik őket. A fény befolyásolja a halak ívását. Amennyiben a reggeli fény megfelelő, a halak rendszerint a hajnalt követő korai órákban rakják le ikráikat.

A nőstény heti rendszerességgel alkalmanként több száz ikra lerakására képes.

A TENYÉSZHALAK TARTÁSÁNAK, SZAPORÍTÁSÁNAK ÉS A KORAI FEJLŐDÉSI STÁDIUMOKBAN LEVŐ EGYEDEK TARTÁSÁNAK FELTÉTELEI

Megfelelő számú egészséges halat kell kiválasztani, és megfelelő minőségű vízben kell tartani (lásd 4. függelék) a tervezett ikráztatás előtt legalább két hétig. Hagyni kell, hogy a halak csoportjának tagjai a vizsgálat során használandó ikrák lerakása előtt legalább egyszer párosodjanak. A halpopuláció sűrűsége ezen időszakban nem haladhatja meg az 1 gramm hal/liter fajlagos értéket. Rendszeres vízcsere vagy víztisztító rendszer használata esetén ennél magasabb egyedsűrűség is lehetséges. A tárolótartályokban a hőmérsékletet 25 ± 2 °C-on kell tartani. A halaknak változatos étrendet kell biztosítani, amely állhat például a kereskedelemben kapható szárított haleledelből, élő, frissen kikelt sóféregből, árvaszúnyoglárvából, Daphniából és televény férgekből (Enchytraeids).

Az alábbiakban vázolt kétféle eljárás a gyakorlatban az elvégzendő vizsgálathoz szükséges megfelelő nagyságú, egészséges és megtermékenyített ikrákat eredményez:

i) Nyolc nőstényt és 16 hímet 50 liter hígítóvizet tartalmazó, a közvetlen fénysugárzástól védett és legalább 48 óráig zavartalanul hagyott tartályban kell tartani. A vizsgálat megkezdése előtti nap délutánján az akvárium alján egy ívatótálcát kell elhelyezni. Az ívatótálca 5–7 cm magas (plexiüvegből vagy más alkalmas anyagból készült) keretből és felül 2–5 mm pórusméretű durva hálóból, alul pedig 10–30 mikron finomságú szitaszövetből áll. A nagyobb pórusméretű hálóhoz szétbontott nejlonkötelekből készült „ívatófákat” kell erősíteni. Miután a halakat 12 órán át sötétben tartják, gyenge fény bekapcsolására az ívás folyamata beindul. Az ívást követő kettő–négy óra múlva ki kell venni az ívatótálcát és be kell gyűjteni az ikrákat. Az ívatótálca használatával megakadályozható, hogy a halak felfalják az ikrákat, ugyanakkor az ikrák összegyűjtése is egyszerűbb. A vizsgálati célra szánt ikrák lerakása előtt a halakat legalább egyszer ívatni kell.

▼B

ii) A tervezett ívatás előtt legalább két hétig kell 5–10 nőstényt, illetve hímet egyedenként elkülönítve tartani. 5–10 nap elteltével a nőstények hasa kezd megduzzadni, és az ivarnyílás környéke kidudorodik. A hímeken ez nem látható. Az ívatásra a fent leírt ívatótálcával felszerelt akváriumban kerül sor. A tartályt hígítóvízzel töltik fel úgy, hogy a víz szintje 5–10 cm-rel ellepje a hálót. A tervezett ivást megelőző napon egy nőstényt és két hímet kell a tartályba helyezni. A víz hőmérsékletét fokozatosan egy fokkal az akklimatizációs hőmérséklet fölé kell emelni. A fény kikapcsolása után a lehető legnagyobb nyugalmat kell biztosítani a tartály környékén. Reggel gyenge fény bekapcsolására az ívás folyamata beindul. 2–4 óra elteltével a halakat ki kell venni és az ikrákat be kell gyűjteni. Amennyiben az egy nősténytől begyűjthetőnél több ikrára van szükség, akkor párhuzamosan több ikráztatótartályt lehet működtetni. Az egyes nőstényeknek a vizsgálat megkezdése előtti, korábbi szaporodási sikerét (az ikrák száma és minősége alapján) feljegyezve ki lehet választani a tenyésztési szempontból a legsikeresebbnek ígérkező példányokat.

Az ikrákat gumiballonnal felszerelt (legalább 4 mm belső átmérőjű) üvegcsövekben kell a tesztedényekbe áthelyezni. Az ikrákkal együtt áthelyezett víz mennyiségének a szállításkor a lehető legkisebb kell lennie. Az ikrák sűrűsége nagyobb, mint a vízé, tehát az ikrák lesüllyednek, és így kikerülnek a csőből. Ügyelni kell arra, hogy az ikrákat (és lárvákat) ne érje levegő. Az egyes adagokból származó mintákat mikroszkóppal megvizsgálva kell biztosítani, hogy ne történjenek rendellenességek az ivadékfejlődés kezdeti fázisaiban. Az ikrák fertőtlenítése nem megengedett.

Az ikrák mortalitása a megtermékenyítést követő első 24 órában a legmagasabb. Ebben az időszakban gyakran 5–40 %-os mortalitás tapasztalható. A sikertelen megtermékenyítés és a fejlődés rendellenességei miatt az ikrák degenerálódnak. Úgy tűnik, hogy az egyes ikraadagok minősége a nőstény hal adottságaitól függ, mivel egyes nőstények rendre jó minőségű ikrákat produkálnak, míg mások sohasem. A fejlődés üteme és az ikrák kikelési aránya is adagonként változó. A sikeresen megtermékenyített ikrák és a szikzacskós lárvák túlélési aránya jó, általában meghaladja a 90 %-ot. 25 °C-on az ikrák a megtermékenyítést követő 3–5 napon belül kikelnek, a szikzacskó pedig az ivadékok a megtermékenyítést követő mintegy 13 napon belül felszívódik.

Az embrionális fejlődés folyamatát Hisaoka és Battle írta le részletesen (2). Az ikrák és az éppen kikelt lárvák átlátszósága miatt a halak fejlődése jól nyomon követhető és a deformált változatok jelenléte megfigyelhető. Az ívást követő mintegy négy óra elteltével megkülönböztethetők a megtermékenyített és a meg nem termékenyített ikrák (3). E vizsgálat céljaira az ikrákat és lárvákat kis térfogatú tesztedényekbe helyezik, és mikroszkóp alatt tanulmányozzák.

A vizsgálatnak a korai egyedfejlődési stádiumokra alkalmazandó feltételeit a 2. függelék sorolja fel. A hígítóvíz optimális pH-értéke 7,8, keménysége 250 mg/$CaCO_3$/liter víz.

SZÁMÍTÁSOK ÉS STATISZTIKA

Két szakaszból álló módszer használata ajánlott. Elsőként a mortalitásra, a rendellenes fejlődésre és a kikelési időre vonatkozó adatok statisztikai elemzésére kerül sor. Ezt követi a testhossz statisztikai elemzése azon koncentrációértékek tekintetében, amelyek esetében az előbb említett adatokkal kapcsolatban nem tapasztaltak kedvezőtlen hatásokat. E módszer használata azért tanácsos, mert a toxikus anyag specifikusan elpusztíthatja a kisebb halakat, késleltetheti a kikelési időt és jelentősen torzult egyedeket produkálhat, ezért eltorzított testhosszeredményekre vezethet. Továbbá így a kezelésenként megmérendő halak száma nagyjából azonos marad, biztosítván a vizsgálat statisztikájának érvényességét.

▼B

AZ LC_{50} ÉS EC_{50} MEGHATÁROZÁSA

Az életben maradt embriók és lárvák százalékos arányát ki kell számítani, és az Abbott-képlet (4) szerint a kontroll mortalitási értékeivel kell korrigálni:

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

ahol:

P = korrigált százalékos túlélés

P' = megfigyelt százalékos túlélés a teszt koncentrációinál

C = százalékos túlélés a kontrollban

Amennyiben lehetséges, az LC_{50}-et a vizsgálat végén egy megfelelő módszerrel meg kell határozni.

Amennyiben kívánatos a morfológiai rendellenességek befoglalása az LC_{50} statisztikákba, erre vonatkozóan Stephan idézett műve (5) ad útmutatást.

A LOEC ÉS A NOEC BECSLÉSE

Az ikra és ivadék túlélési kísérlet egyik célja a nem zéró koncentrációértékek összevetése a kontrollcsoporttal, azaz a LOEC értékének meghatározása. Ezért a többszörös összehasonlítás módszerét kell hasznosítani (6) (7) (8) (9) (10).

SZAKIRODALOM

(1) LAALE H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, pp. 121-173.

(2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 pp.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173-181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1-333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.

(6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103-117.

(9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519-531.

(10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H., Freeman and Co., San Francisco.

▼B

2. függelék

VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEK, IDŐTARTAM ÉS A JAVASOLT FAJOK TÚLÉLÉSI KRITÉRIUMAI

Faj	Hőmérséklet (°C)	Sótartalom (0/00)	Megvilágítás (óra)	Fázisok időtartama (nap)		A vizsgálat átlagos időtartama	Kontrollcsoport túlélési aránya (min., %)	
				Embrió	Szikzacskós lárva		Kikelés sikeressége	A lárvák túlélése
ÉDESVÍZI								
Brachydanio rerio Zebrahal	25 ± 1	—	12–16	3–5	8–10	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban) a kikelést követő 5. napig (8-10 nap)	80	90
Oncorhynchus mykiss	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (a)	30–35	25–30	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban) a kikelést követő 20. napig (50–55 nap)	66	70
Cyprinus carpio Közönséges ponty	21–25	—	12–16	5	>4	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban) a kikelést követő 4. napig (8-9 nap)	80	75
Oryzias latipes Japán rizshal/Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12–16	8–11	4–8	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban) a kikelést követő 5. napig (13–16 nap)	80	80
Pimephales promelas Nagyfejű cselle	25 ± 2	—	16	4-5	5	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban) a kikelést követő 4. napig (8-9 nap)	60	70

(1) Embriókra vonatkozik.
(2) Lárvákra vonatkozik.
(a) A lárvákat és embriókat a kikelés után egy hétig sötétben kell tartani, kivéve a vizsgálatok idejét. Ezt követően a vizsgálat folyamán mindvégig félhomályt kell fenntartani.

02008R0440 — HU — 16.10.2019 — 008.001 — 1736

▼B

3. függelék

Más, jól dokumentált halfajokra vonatkozó vizsgálati körülmények, időtartam és túlélési kritériumok

Faj	Hőmérséklet (°C)	Sótartalom (0/00)	Megvilágítás (óra)	Fázisok idotartama (nap)		Az embrió- és a szikzacskóvizsgálat jellemző időtartama	Kontrollcsopo rt túlélési aránya, (min., %)	
				Embrió	Szikzacskós lárva		Kikelés sikeressége	A lárvák túlélése
ÉDESVÍZI FAJOK								
Carassius auratus Ezüstkárász	24 ± 1	—	—	3–4	>4	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban), a kikelést követő 4. napig (7 nap)	—	80
Leopomis macrochirus Nagy naphal	21 ± 1	—	16	3	>4	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban), a kikelést követő 4. napig (7 nap)	—	75
TENGERI								
Menidia peninsulae Tidewater silverside (nincs magyar neve)	22 –25	15–22	12	1,5	10	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban), a kikelést követő 5. napig (6-7 nap)	80	60
Clupea harengus Hering	10 ± 1	8–15	12	20–25	3–5	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban), a kikelést követő 3. napig (23-27 nap)	60	80
Gadus morhua Tőkehal	5± 1	5–30	12	14–16	3–5	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban), a kikelést követő 3. napig (18 nap)	60	80
Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow	25 ± 1	15–30	12	—	—	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban), a kikelést követő 4/7. napig (28 nap)	>75	80

▼B

4. függelék

AZ ELFOGADHATÓ MINŐSÉGŰ HÍGÍTÓVÍZ NÉHÁNY FONTOSABB KÉMIAI TULAJDONSÁGA

Anyag megnevezése	Koncentrációértékek
Lebegőanyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 mg/l
Nem ionizált ammónia	< 1 µg/l
Maradék klór	< 10 µg/l
Összes szerves foszfortartalmú peszticid	< 50 ng/l
Összes szerves klórtartalmú peszticid es poliklórozott bifenilek	< 50 ng/1
Összes szerves klór	< 25 ng/1

▼B

C.16. HÁZIMÉH – AKUTORÁLISTOXICITÁS-VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

Ezen akuttoxicitás-vizsgálat megfelel az OECD TG 213-nak (1998).

1.1. BEVEZETÉS

E toxicitásvizsgálat olyan laboratóriumi módszer, amelyet annak felmérésére dolgoztak ki, hogy a növényvédő szerek és más vegyi anyagok milyen mértékű akut orális toxicitást gyakorolnak a felnőtt dolgozó háziméhekre.

Az anyagok toxikus jellemzőinek a felmérése és értékelése a háziméhekre gyakorolt akut orális toxicitás mértékének a meghatározását igényelheti, pl. olyan körülmények között, amikor valószínű, hogy a méhek ki lesznek téve egy adott vegyi anyag hatásának. Az akutorálistoxicitás-vizsgálatot a peszticidek és más vegyi anyagok méhekre gyakorolt inherens toxicitásának meghatározására végzik. A vizsgálat eredményeit felhasználják annak meghatározására, hogy szükség van-e további minősítésre. E módszer különösen azon többlépcsős programokban használható jól, amelyekben a peszticidek méhekre kifejtett hatását először a laboratóriumokban, majd részlegesen terepen, végül terepen vizsgálják (1). A peszticideket hatóanyaguk formájában vagy formulázott termékként lehet vizsgálni.

Toxikus referenciaanyagot használnak a méhek érzékenységének és a vizsgálati eljárás pontosságának az ellenőrzésére.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Akut orális toxicitás: a vizsgált anyag egyszeri, orálisan adott dózisának beadásától számított legfeljebb 96 órás időszakon belül jelentkező károsító hatás.

Dózis: a vizsgált anyag elfogyasztott mennyisége. A dózis az egy kísérleti állatnak beadott vizsgált anyag mikrogrammban kifejezett mennyisége (mg/méh). Az egyes méhekre jutó dózis tényleges mennyisége nem számítható ki pontosan, mert a méheket kollektívan tápláljuk, ezért csak egy átlagos dózist lehet megbecsülni (az összesen elfogyasztott vizsgált anyag osztva az egy méhkasban lévő kísérleti méhek számával).

LD_{50} (közepes halálos dózis): szájon át: a vizsgált anyag statisztikailag megállapított egyszeri olyan dózisa, amely orálisan beadva az állatok 50 %-ának elhullását okozza. Az LD_{50} értékét a vizsgált anyag egy méhre jutó mennyiségével (mg/méh) fejezik ki. A peszticidek esetében a vizsgált anyag lehet az aktív hatóanyag, vagy az egy vagy több hatóanyagot tartalmazó formulázott termék.

Mortalitás: egy állat akkor nyilvánítható elhullottnak, ha teljesen mozdulatlan.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgálat során a kifejlett dolgozó háziméheknek *(Apis mellifera)* vizes cukoroldatban különböző töménységben diszpergált vizsgált anyagot adagolnak. Ezután a méheket tesztanyagot nem tartalmazó cukoroldattal táplálják. A mortalitást legalább 48 órán át naponta feljegyzik és összehasonlítják a kontrollcsoport adataival. Ha az elhullási arány a 24. és a 48. óra között is növekszik, míg a kontrollcsoportban elfogadható szinten, azaz < 10 %-on marad, helyénvaló a vizsgálat időtartamát maximum 96 órára meghosszabbítani. Az eredményeket elemzik a 24. és a 48. órai LD_{50} érték, illetve ha a vizsgálat időtartamát meghosszabbítják, akkor a 72. és a 96. órai LD_{50} érték meghatározásához.

▼B

1.4. A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGÉNEK KRITÉRIUMAI

A vizsgálat érvényességéhez a következő feltételeknek kell teljesülniük:

— a vizsgálat végén a teljes kontrollcsoport létszámához viszonyított átlagos mortalitás nem haladhatja meg a 10 %-ot,

— a toxikus referenciaanyag LD_{50} értéke megfelel a kijelölt tartománynak.

1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.5.1. **A méhek befogása**

A vizsgálatokhoz azonos eredetű, fiatal, kifejlett dolgozó háziméheket használnak, azaz azonos életkorú, tápláltsági fokú stb. méheket. A méheket megfelelően táplált, egészséges, lehetőleg betegségektől mentes és királynővel rendelkező, ismert előéletű és fiziológiai állapotú kolóniákból fogják be. A méheket a felhasználás reggelén vagy azt megelőző estén célszerű befogni, és a következő napig a vizsgálati körülmények között tartják őket. Az utódokat nem tartalmazó keretekről gyűjtött méhek alkalmasak. Kerülni kell a kora tavasszal vagy késő ősszel történő befogást, mivel a méhek fiziológiája ebben az időszakban megváltozik. Ha a vizsgálatokat mégis kora tavasszal vagy késő ősszel végzik, a méheket „inkubátorban” elő lehet csalogatni és egy hétig „méhkenyérrel” (a lépből gyűjtött pollennel) és cukros vízzel lehet táplálni. A vegyi anyagokkal, pl. antibiotikumokkal, méhatka elleni szerekkel stb. kezelt méheket toxicitásvizsgálatok céljaira csak az utolsó kezeléstől számított négy hét elteltével szabad felhasználni.

1.5.2. **Tartási és etetési feltételek**

Könnyen tisztítható és jól szellőző dobozokat kell használni. Erre a célra bármilyen alkalmas anyag felhasználható, pl. rozsdamentes acél, drótháló, műanyagból készült, vagy eldobható, fából készült stb. doboz. Dobozonként tíz méhből álló csoportok használata javasolt. A vizsgálati dobozok méreteit a méhek létszámához igazítják, azért, hogy elegendő helyük legyen.

A méheket 25 ± 2 °C hőmérsékletű sötét kísérleti szobában tartják. A vizsgálat során végig megmérik és feljegyezik a relatív páratartalom értékét, amelyet általában 50–70 % között tartanak. A méhekkel kapcsolatos minden tevékenység, beleértve a kezelést és megfigyeléseket, végezhető világosban (nappali fény mellett). Táplálékként 500 g/liter (azaz 50 tömegszázalékos) végkoncentrációjú vizes cukoroldatot adnak. A meghatározott tesztanyagmennyiséget tartalmazó táplálékot az állatoknak tetszés szerinti módon adhatják. Az etetőrendszernek lehetővé kell tennie, hogy dobozonként fel lehessen jegyezni a táplálékbevitelt (lásd 1.6.3.1. szakasz). A táplálék beadásához egy (mintegy 50 mm hosszú és 10 mm széles, a nyitott végén kb. 2 mm átmérőre leszűkített) üvegcsövet lehet használni.

1.5.3. **A méhek előkészítése**

A befogott méheket a teszthelyiségben véletlenszerűen elhelyezett dobozok között osztják el.

▼B

A méheket a vizsgálat megkezdése előtt maximum két órán át éheztethetik. Javasolt a méhek táplálékának visszatartása a kezelés előtt, hogy valamennyi méh béltartalma azonos legyen a vizsgálat kezdetekor. A vizsgálat megkezdése előtt a haldokló méheket eltávolítják, és egészségesekkel pótolják.

1.5.4 **A dózisok előkészítése**

Ha a vizsgált anyag oldható vízben, akkor az közvetlenül belekeverhető az 50 %-os töménységű cukoroldatba. A vízben rosszul oldódó ipari termékek és anyagok esetében fel lehet használni a méhekre kis mértékben mérgező segédanyagokat – szerves oldószereket, emulgeáló- vagy diszpergálószereket (pl. aceton, dimetil-formamid, dimetil-szulfoxid). A segédanyag töménysége a vizsgált anyag oldhatóságától függ, és azt az összes vizsgált koncentrációérték esetében azonos szinten tartják. Általában azonban megfelel az 1 %-os töménységű segédanyag, és ezt a szintet nem célszerű túllépni.

Megfelelő kontrolloldatokat készítenek elő, azaz ha oldószert vagy diszpergáló anyagot használnak a vizsgált anyag feloldásához, akkor két különálló kontrollcsoportot alkalmaznak: az egyiket a vizes oldatra, a másikat az oldatok adagolásához használt koncentrációjú oldószerrel/segédanyaggal javított cukoroldatra.

1.6. VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

1.6.1. **Kezelt csoportok és kontrollcsoportok**

A vizsgált dózisok és a párhuzamos vizsgálatok száma meg kell, hogy feleljen az LD_{50} 95 %-os konfidenciahatár mellett történő meghatározására vonatkozó statisztikai követelményeknek. A vizsgálathoz szokványos esetben öt, olyan mértani sort képező dózisra van szükség, amelyek 2.2 értéket meg nem haladó szorzótényezővel különböznek egymástól és az LD_{50} tartományát fedik le. A hígítási tényezőt és az adagoláshoz használt koncentrációértékek számát azonban a hatásgörbe meredekségének függvényében (pusztulás a dózis függvényében) és az eredmények elemzéséhez kiválasztott statisztikai módszer figyelembevételével határozzák meg. A vizsgálat előtt elvégzett, dózisbehatároló vizsgálat lehetővé teszi az adagoláshoz megfelelő koncentrációértékek kiválasztását.

Legalább három, egyenként tíz méhből álló ún. párhuzamosan kezelt csoportnak adják be az egyes kísérleti koncentrációknak megfelelő dózist. A vizsgálatsorozatban részt vevőkön kívül legalább három, egyenként tíz méhből álló kontrollcsoportot kell vizsgálni. Ha szükséges (lásd 1.5.4. rész), külön oldószeres/segédanyagos kontrollokat is alkalmaznak.

1.6.2. **Toxikus referenciaanyag**

A tesztsorozattal párhuzamosan egy, a toxikus referenciaanyagot tartalmazó sorozatot is be kell állítani. A várható LD_{50} értékek lefedése érdekében legalább három dózist választanak ki. Mindegyik vizsgált dózis esetében legalább három, egyenként tíz méhet tartalmazó, ún. párhuzamosokat alkalmaznak. A leggyakrabban használt toxikus referenciaanyag a dimetoát, amelyre nézve a bizonyított orális LD_{50} 24 óra alatt a 0,10–0,35 mg hatóanyag/egyed tartományba esik (2). Egyéb toxikus referenciaanyagok is elfogadhatóak, de csak olyan esetekben, ahol elegendő adat áll rendelkezésre a várható dózisreakció ellenőrzésére (pl. parathion).

▼B

1.6.3. **Expozíció**

1.6.3.1. *A dózisok beadása*

Mindegyik kezelt csoport egyedeinek 100–200 ml-nyi, a vizsgált anyagot megfelelő koncentrációban tartalmazó 50 %-os cukoroldatot adnak be. Nagyobb mennyiségre van szükség, ha a készítményben rosszul oldódó, alacsony toxicitású vagy a formulázásból adódóan alacsony hatóanyag-tartalmú termékek vannak, mert ezeket nagyobb arányban kell a cukoroldathoz keverni. Megfigyelik, hogy az egyes csoportok milyen mennyiségben fogyasztottak a kezelt táplálékból. Ha elfogyasztották a felkínált élelmet (rendszerint 3-4 órán belül), akkor az etetőtálat kiveszik a dobozból, és helyére egy tisztán cukoroldatot tartalmazó tálat tesznek. Ezután a cukoroldatot korlátozás nélkül adagolják. Egyes vegyületek esetében magasabb koncentrációértékeknél a vizsgált dózis visszautasítása miatt a méhek esetleg keveset vagy semmit sem fogyasztanak. Maximum 6 óra elteltével az el nem fogyasztott, kezelt táplálékot tiszta cukoroldattal váltják fel. Megmérik, hogy mennyi fogyott a kezelt táplálékból (pl. a megmaradó táplálék térfogatának/tömegének mérésével).

1.6.3.2. *Időtartam*

A vizsgálat javasolt időtartama a vizsgált oldatok tisztán cukoroldattal való felváltását követően még 48 óra. Ha a mortalitás az első 24 óra után továbbra is 10 %-nál nagyobb mértékben növekszik, akkor a vizsgálat időtartamát maximum 96 órára kell meghosszabbítani, feltéve, hogy a kontrollcsoportban a mortalitás nem haladja meg a 10 %-ot.

1.6.4. **Megfigyelések**

Feljegyezik a mortalitás alakulását a vizsgálat megkezdését követő 4. órában, majd azt követően a 24. és 48. órában (azaz a dózis beadását követően). Ha a meghosszabbított megfigyelési időszakra van szükség, akkor a további értékeléseket 24 órás időközönként kell elvégezni, legfeljebb a 96. óráig, feltéve, hogy a kontrollcsoportban a mortalitás nem haladja meg a 10 %-ot.

Megmérik az egyes csoportok által elfogyasztott táplálék mennyiségét. Az adott 6 óra alatt a kezelt és a kezeletlen táplálékból való fogyasztás mértékének összevetése tájékoztat a kezelt étrend ízletességéről.

A vizsgálat időszaka alatt feljegyeznek minden, a normálistól eltérő magatartásformát.

1.6.5. **Tűrésteszt**

Egyes esetekben (pl. amikor a vizsgált anyag várható toxicitása alacsony) tűrésteszttet lehet végezni, 100 mg aktív hatóanyag/egyed felhasználásával, annak bemutatására, hogy az LD_{50} nagyobb ezen értéknél. Ugyanezt az eljárást követik, beleértve a vizsgált dózisra vonatkozó három ún. párhuzamosan kezelt csoportot, a megfelelő kontrollokat, az elfogyasztott kezelt táplálék mennyiségének értékelő felmérését és a toxikus referenciaanyag használatát. Ha mortalitás tapasztalható, a teljes körű vizsgálatot végzik el. Ha szubletális hatások figyelhetők meg (lásd 1.6.4. szakasz), azokat feljegyezik.

▼B

2. **ADATOK ÉS JELENTÉSKÉSZÍTÉS**

2.1. ADATOK

Az adatokat táblázat formájában foglalják össze, mindegyik kezelt csoportnál, valamint kontroll- és toxikusreferenciaanyag-csoportnál feltüntetve a kísérlethez felhasznált méhek számát, az egyes megfigyelési időpontokban tapasztalt mortalitást, valamint a rendellenes magatartást mutató méhek számát. A mortalitási adatokat a megfelelő statisztikai módszerekkel elemzik (pl. probitanalízis, mozgóátlag, binomiális valószínűség) (3) (4). A hatásgörbéket mindegyik ajánlott megfigyelési időpontban grafikonon rögzítik, és a görbék meredekségét és a közepes halálos dózisokat (LD_{50}) a 95 %-os konfidenciahatárhoz kiszámítják. A kontrollcsoport mortalitásának korrekcióját az Abbott-képlet használatával lehet elvégezni (4) (5). Ha a méhek nem fogyasztották el a vizsgált anyaggal kezelt táplálék teljes mennyiségét, meghatározzák az egyes csoportok által elfogyasztott vizsgált anyaggal bevitt dózis nagyságát. Az LD_{50} értékét az egy méhre jutó vizsgált anyag mg-jában fejezik ki.

2.2. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésben a következő információk szerepelnek:

2.2.1 **A vizsgált anyag:**

— az anyag fizikai természete és főbb fizikai-kémiai tulajdonságai (pl. stabilitása vízben, gőznyomás),

— kémiai azonosító adatok, beleértve a szerkezeti képletet és a kémiai tisztaságot (azaz peszticidek esetében a hatóanyag(ok) megnevezését és koncentrációját).

2.2.2. **A vizsgált fajok:**

— tudományos név, származás, hozzávetőleges életkor (hetekben kifejezve), a befogás módszere és dátuma,

— a kolóniákra vonatkozó információk, ahonnan a begyűjtött állatok származnak, beleértve a méhek egészségi állapotát, bármilyen kifejlett kori betegséget, esetleges előkezeléseket stb.

2.2.3. **Vizsgálati körülmények:**

— a kísérleti helyiség hőmérséklete és relatív páratartalma,

— elhelyezési körülmények, pl. a dobozok típusa, mérete és anyaga,

— a törzsoldat és a vizsgált oldatok készítésének módszere (ha oldószert használnak, meg kell adni a nevét és töménységét),

— a törzsoldat készítésének módja és az újrakezdés gyakorisága (az esetlegesen használt, oldódást segítő szer nevét és koncentrációját meg kell adni), a vizsgálat körülményei, pl. a felhasznált kísérleti koncentrációk száma, a kontrollok száma; minden egyes kísérleti koncentrációra és kontrollra nézve az ún. párhuzamosok és az egy dobozban lévő méhek száma,

— a vizsgálat időpontja.

▼B

2.2.4. **Eredmények:**

— előzetes koncentrációhatárokat felmérő vizsgálat eredményei, ha végeztek ilyet,

— nyers adatok: mortalitás minden egyes vizsgált dózisra és minden egyes megfigyelési időpontra nézve,

— a hatásgörbék grafikonja a vizsgálat végén,

— LD_{50} értékek 95 % konfidenciahatárhoz, minden egyes javasolt megfigyelési időpontokban, a vizsgált anyagra és a toxikus referenciaanyagra nézve,

— az LD_{50} meghatározásához használt statisztikai eljárások,

— mortalitás a kontrollcsoportokban,

— más megfigyelt vagy mért biológiai hatások, pl. a méhek abnormális viselkedése (beleértve a vizsgált dózis elutasítását), az elfogyasztott táplálék mértéke kezelt és a kezeletlen csoportoknál,

— bármilyen eltérés az itt leírt vizsgálati módszerektől, valamint bármely más releváns információ.

3. **SZAKIRODALOM**

(1) EPPO/COUNCIL OF Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., Mclndoe, E. C, Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (Apis mellifera L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265-267.

▼B

C.17. HÁZIMÉH – AKUTKONTAKTTOXICITÁS-VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

Ezen akutkontakttoxicitás-vizsgálat megfelel az OECD TG 214-nek (1998).

1.1. BEVEZETÉS

E toxicitásvizsgálat olyan laboratóriumi módszer, amelyet annak felmérésére dolgoztak ki, hogy a növényvédő szerek és más vegyi anyagok milyen mértékű akut kontakt toxicitást gyakorolnak a felnőtt dolgozó háziméhekre.

Az anyagok toxikus jellemzőinek a felmérése és értékelése a háziméhekre gyakorolt akut kontakt toxicitás mértékének a meghatározását igényelheti, pl. olyan körülmények között, amikor valószínű, hogy a méhek ki lesznek téve egy adott vegyi anyag hatásának. Az akutkontakttoxicitás-vizsgálatot a peszticideknek és más vegyi anyagoknak a méhekre gyakorolt inherens toxicitásának meghatározására végzik. A vizsgálat eredményeit felhasználják annak meghatározására, hogy szükség van-e további minősítésre. E módszer különösen azon többlépcsős programokban használható jól, amelyekben a peszticidek méhekre kifejtett hatását először a laboratóriumban, majd részlegesen terepen, végül terepen vizsgálják (1). A peszticideket hatóanyaguk formájában (a.s.) vagy formulázott termékként lehet vizsgálni.

Toxikus referenciaanyagot kell használni a méhek érzékenységének és a vizsgálati eljárás pontosságának az ellenőrzésére.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Akut kontakt toxicitás: egyszeri, helyileg alkalmazott tesztanyagdózis, maximum 96 órán belül jelentkező károsító hatása.

Dózis: a vizsgált anyag elfogyasztott mennyisége. A dózis az egy kísérleti állatnak beadott vizsgált anyag mikrogrammban kifejezett mennyisége (μg/méh).

Kontakt LD_{50} (közepes halálos dózis): valamely anyag statisztikailag megállapított egyszeri olyan dózisa, amely érintkezés útján az állatok 50 %-ának elhullását okozza. Az LD_{50} értéket a vizsgált anyag egy méhre jutó mennyiségével (μg/méh) fejezzük ki. A peszticidek esetében a vizsgált anyag lehet a hatóanyag, vagy egy vagy több hatóanyagot tartalmazó formulázott termék is.

Halálozás: egy állat akkor nyilvánítható elhullottnak, ha teljesen mozdulatlan.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgálat során a kifejlett dolgozó háziméheket *(Apis mellifera)* a vizsgált anyag megfelelő hordozóanyagban, különböző töménységben oldott dózisaival kezelik úgy, hogy azt közvetlenül a torra cseppentik. A vizsgálat időtartama 48 óra. Ha az elhullási arány a 24. és 48. óra között is növekszik, míg a kontrollcsoportban egy elfogadható szinten, azaz £ 10 %-on marad, helyénvaló a vizsgálat időtartamát legfeljebb 96 órára meghosszabbítani. A elhullást naponta rögzítik és összehasonlítják a kontrollértékekkel. Az eredményeket elemzik a 24. és a 48. órai LD_{50} érték, illetve ha a vizsgálatot meghosszabbítják, akkor a 72. és 96. órai LD_{50} érték meghatározásához.

▼B

1.4. A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGÉNEK KRITÉRIUMAI

A vizsgálat érvényességéhez a következő feltételeknek kell teljesülniük:

— a vizsgálat végére a teljes kontrollcsoport létszámához viszonyított átlagos mortalitás nem haladhatja meg a 10 %-ot,

— a toxikus referenciaanyag LD_{50} értéke megfelel a kijelölt tartománynak.

1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.5.1. **A méhek befogása**

A vizsgálatokhoz fiatal, kifejlett dolgozó háziméheket használnak, azaz azonos életkorú, tápláltsági fokú, fajú stb. méheket. A méheket megfelelően táplált, és – amennyire csak lehetséges – betegségektől mentes és királynővel rendelkező, ismert előéletű és fiziológiai állapotú kolóniákból fogják be. A méheket a felhasználás reggelén vagy az azt megelőző estén célszerű befogni, és a következő napig a vizsgálati körülmények között tartják őket. Az ivadékokat nem tartalmazó keretekről gyűjtött méhek alkalmasak. Kerülni kell a kora tavasszal vagy késő ősszel történő befogást, mivel a méhek fiziológiája ezen időszakban megváltozik. Ha a vizsgálatokat mégis kora tavasszal vagy késő ősszel végzik, a méheket inkubátorba téve elő lehet csalogatni és egy hétig „méhkenyérrel” (a lépről gyűjtött pollennel) és cukros vízzel lehet táplálni. A vegyi anyagokkal, pl. antibiotikummal, méhatka elleni szerekkel stb. kezelt méheket toxicitásvizsgálatok céljaira csak az utolsó kezeléstől számított négy hét elteltével szabad felhasználni.

1.5.2. **Tartási és etetési feltételek**

Könnyen tisztítható és jól szellőző dobozokat kell használni. E célra bármilyen alkalmas anyag felhasználható, pl. rozsdamentes acél, drótháló, műanyag vagy eldobható, fából készült stb. dobozok. A vizsgálati dobozok méreteit a méhek létszámához igazítják, hogy elegendő helyük legyen. Dobozonként tíz méhből álló csoportok használata javasolt.

A méheket 25 ± 2 °C hőmérsékletű sötét teszthelyiségben tartják. A vizsgálat során végig megmérik és feljegyzik a relatív páratartalom értékét, amelyet általában 50–70 % között tartanak. A méhekkel kapcsolatos minden tevékenység, beleértve a kezelést és megfigyeléseket, végezhető világosban (nappali fény mellett). Táplálékként 500 g/liter (azaz 50 tömegszázalékos) végkoncentrációjú vizes cukoroldatot alkalmaznak, és a vizsgálat ideje alatt korlátozás nélkül adagolják méhetető berendezés felhasználásával. Ez lehet egy üvegcső (körülbelül 50 mm hosszú és 10 mm széles, amelynek nyitott végén körülbelül 2 mm átmérőre leszűkített).

1.5.3. **A méhek előkészítése**

A befogott méheket a vizsgált anyag elhelyezése érdekében szén-dioxiddal vagy nitrogénnel lehet elkábítani. Minimalizálni kell az alkalmazott narkotikum mennyiségét és az expozíció időtartamát. A vizsgálat megkezdése előtt a haldokló méheket eltávolítják, és egészségesekkel pótolják.

1.5.4. **A dózisok előkészítése**

A vizsgált anyagot valamilyen hordozóanyagban, azaz szerves oldószerben oldva vagy detergenst tartalmazó vizes oldatban alkalmazzák. Szerves oldószerként előnyben részesül az aceton, de a méhekre kis mértékben mérgező egyéb szerves oldószereket is lehet használni (pl. dimetil-formamid, dimetil-szulfoxid). A vízben diszpergált formulázott termékek és az erősen poláros szerves anyagok esetében, amelyek szerves oldószerekben nem oldódnak, a kísérlethez használt oldatokat könnyebb felvinni, ha azt a kereskedelemben szokásos detergens (pl. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween) híg oldatában készítik elő.

▼B

A megfelelő kontrolloldatokat előkészítik, azaz ha oldószert vagy diszpergálószert használnak a vizsgált anyag feloldásához, akkor két különálló kontrollcsoportot alkalmaznak, egyet vízzel, egyet pedig az oldószerrel/diszpergálószerrel kezelve.

1.6. VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

1.6.1. **Kezelt csoportok és kontrollcsoportok**

A vizsgált dózisok és a párhuzamos vizsgálatok száma meg kell, hogy feleljen az LD_{50} 95 %-os konfidenciahatár mellett történő meghatározására vonatkozó statisztikai követelményeknek. A vizsgálathoz szokványos esetben öt, olyan mértani sort képező dózisra van szükség, amelyek 2.2 értéket meg nem haladó szorzótényezővel különböznek egymástól, és az LD_{50} tartományát fedik le. A dózisok számát azonban a hatásgörbe (pusztulás a dózis függvényében) meredekségének függvényében és az eredmények elemzéséhez kiválasztott statisztikai módszer figyelembevételével határozzák meg. A vizsgálat előtt elvégzett, dózisbehatároló vizsgálat lehetővé teszi a megfelelő dózisok kiválasztását.

Legalább három, egyenként tíz méhből álló ún. párhuzamos kezelt csoportot használnak fel minden egyes kísérleti koncentrációnak megfelelő dózishoz.

A vizsgálatsorozatban részt vevőkön kívül legalább három, egyenként tíz méhből álló kontrollcsoportot vizsgálnak. Ha szerves oldószert vagy detergenst használnak, az oldószerre vagy a detergensre nézve három további, egyenként tíz méhből álló kontrollcsoportot vizsgálnak.

1.6.2. **Toxikus referenciaanyagok**

A tesztsorozattal párhuzamosan egy, a toxikus referenciaanyagot tartalmazó sorozatot is be kell állítani. A várható LD_{50} értékek lefedése érdekében legalább három dózist választanak ki. Mindegyik vizsgált dózis esetében legalább három, egyenként tíz méhet tartalmazó, ún. párhuzamost alkalmaznak. A javasolt referenciaanyag a dimetoát, amelynek 24 órás kontakt LD_{50} értéke a 0,10–0,30 μg hatóanyag/egyed (2) tartományba esik. Egyéb toxikus referenciaanyagok is elfogadhatóak, azonban csak olyan esetekben, ahol elegendő adat áll rendelkezésre a várható dózisreakció ellenőrzésére (pl. paration).

1.6.3. **Expozíció**

1.6.3.1. *A dózisok beadása*

Az elkábított méheket egyenként kezelik külsőleg a vizsgált anyaggal. A méheket véletlenszerűen rendelik a különböző vizsgált dózisokhoz és kontrollokhoz. Mindegyik méh torának háti részére viszik fel mikroapplikátorral a vizsgált anyagot a megfelelő koncentrációban tartalmazó oldat egy μl mennyiségét. Indokolt esetben más mennyiségeket lehet alkalmazni. A felvitelt követően a méheket elosztják a kísérleti dobozok között, és ellátják cukoroldattal.

1.6.3.2. *Időtartam*

A vizsgálat időtartama lehetőség szerint 48 óra. Ha a mortalitás a 24. és a 48. óra között 10 %-nál nagyobb mértékben növekszik, a vizsgálat időtartamát maximum 96 órára meghosszabbítják, feltéve, hogy a kontrollcsoportban a mortalitás nem haladja meg a 10 %-ot.

▼B

1.6.4. **Megfigyelések**

Feljegyzik a mortalitás alakulását a dózis bevitelét követő negyedik órában, ezt követően a 24. és a 48. órában. Ha a meghosszabbított megfigyelési időszakra van szükség, akkor a további értékeléseket 24 órás időközönként végezik el, legfeljebb a 96. óráig, feltéve, hogy a kontrollcsoportban a mortalitás nem haladja meg a 10 %-ot.

A vizsgálat időszaka alatt feljegyeznek minden, a normálistól eltérő magatartásformát.

1.6.5. **Tűrésteszt**

Egyes esetekben (pl. amikor valamely vizsgált anyag várható toxicitása alacsony) tűrésteszetet lehet végezni, 100 μg hatóanyag/egyed dózis felhasználásával annak bemutatására, hogy az LD_{50} nagyobb ezen értéknél. Ugyanezt az eljárást követik, beleértve a vizsgált dózisra vonatkozó három ún. párhuzamos kezelt csoportot, a megfelelő kontrollokat, valamint a toxikus referenciaanyag használatát. Ha mortalitás tapasztalható, teljes körű vizsgálatot végeznek el. Ha szubletális hatások figyelhetők meg (lásd 1.6.4. szakasz), azokat feljegyzik.

2. **ADATOK ÉS JELENTÉSKÉSZÍTÉS**

2.1. ADATOK

Az adatokat táblázat formájában foglalják össze, mindegyik kezelt csoportnál, valamint kontroll- és toxikus referenciaanyaggal kezelt csoportnál feltüntetve a kísérlethez felhasznált méhek számát, az egyes megfigyelési időpontokban tapasztalt mortalitást, valamint a rendellenes magatartást tanúsító méhek számát. A mortalitási adatokat megfelelő statisztikai módszerekkel elemezik (pl. probitanalízis, mozgóátlag, binomiális valószínűség) (3) (4). A hatásgörbéket mindegyik ajánlott megfigyelési időpontban (azaz a 24., 48. és adott esetben a 72. és 96. órában) grafikonon rögzítik, és a görbék meredekségét és a közepes halálos dózisokat (LD_{50}) a 95 %-os konfidenciahatárhoz kiszámítják. A kontrollcsoport mortalitásának korrekcióját az Abbott-képlet alkalmazásával lehet elvégezni (4) (5). Az LD_{50} értékét az egy méhre jutó vizsgált anyag μg-jában fejezik ki.

2.2 VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésben a következő információknak kell szerepelniük:

2.2.1. **A vizsgált anyag:**

— az anyag fizikai természete és főbb fizikai-kémiai tulajdonságai (pl. stabilitása vízben, gőznyomás),

— kémiai azonosító adatok, beleértve a szerkezeti képletet és a kémiai tisztaságot (azaz peszticidek esetén a hatóanyag(ok) megnevezését és koncentrációját).

2.2.2. **A vizsgált fajok:**

— tudományos név, származás, hozzávetőleges életkor (hetekben kifejezve), a befogás módszere és dátuma,

— a kolóniákra vonatkozó információk, ahonnan a begyűjtött állatok származnak, beleértve a méhek egészségi állapotát, bármilyen kifejlett kori betegséget, esetleges előkezeléseket stb.

▼B

2.2.3. **Vizsgálati körülmények:**

— a kísérleti helyiség hőmérséklete és relatív páratartalma,

— elhelyezési körülmények, beleértve a dobozok típusát, méretét és anyagát,

— a vizsgált anyag beadásának módszerei, pl. a hordozó oldószer, alkalmazott vizsgált oldat mennyisége, felhasznált narkotikum,

— a vizsgálat körülményei, pl. felhasznált vizsgált dózisok száma, a kontrollok száma; minden egyes vizsgált dózisra és kontrollra nézve az ún. párhuzamosok és az egy dobozban lévő méhek száma,

— a vizsgálat időpontja.

2.2.4. **Eredmények:**

— előzetes koncentrációhatárokat felmérő vizsgálat eredményei, ha végeztek ilyet,

— nyers adatok: mortalitás minden egyes vizsgált dózisra és minden egyes megfigyelési időpontra nézve,

— a hatásgöbék grafikonja a vizsgálat végén,

— LD_{50} értékek, 95 %-os konfidenciahatárhoz, az egyes javasolt megfigyelési időpontokban, a vizsgált anyagra és a toxikus referenciaanyagra nézve,

— az LD_{50} meghatározásához használt statisztikai eljárások,

— mortalitás a kontrollcsoportokban,

— más megfigyelt vagy mért biológiai hatások és a méhek bármilyen abnormális reakciója,

— bármilyen eltérés az itt leírt vizsgálati módszerektől, valamint bármely más releváns információ.

3. **SZAKIRODALOM**

(1) EPPO/COUNCIL OF Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N. 1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E. C, Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (Apis mellifera L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.

▼B

C.18. KÉMIAI ANYAGOK TALAJON TÖRTÉNŐ ADSZORPCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA EGYENSÚLYI RENDSZERBEN

1. MÓDSZER

E módszer megfelel az OECD TG 106-nak: a talajon történő adszorpció/deszorpció meghatározása egyensúlyi rendszerben (2000).

1.1. BEVEZETÉS

A módszer az adszorpciós vizsgálat kialakításához figyelembe veszi a talaj kiválasztására vonatkozó körvizsgálatot és műhelymunkát (1) (2) (3) (4), valamint a meglévő nemzeti iránymutatásokat (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Az adszorpciós/deszorpciós vizsgálatok segítségével információkat nyerhetünk a vegyszerek mobilitására, illetve ezeknek a bioszféra talaj, víz és levegő kompartmentjei közötti megoszlására nézve (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Az információt fel lehet használni a következők előrejelzésére vagy becslésére: valamely vegyi anyag hozzáférhetősége a lebontás szempontjából (22) (23), élőlények általi felvétel és átalakítás (24); az anyag mozgása a talaj profilban (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28); talajból való kipárolgás (21) (29) (30); a talajból természetes vizekbe irányuló bemosódás (18) (31) (32). Adszorpciós adatokat összehasonlítási és modellezési célra lehet használni (19) (33) (34) (35).

A talajban egy vegyi anyag szilárd és folyadékfázis közti megoszlása összetett folyamat, amely több különböző tényezőtől függ: az anyag kémiai jellegétől (12) (36) (37) (38) (39) (40), a talaj jellemzőitől (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49), valamint olyan éghajlati tényezőktől, mint a csapadék, hőmérséklet, napsugárzás és szél. Így valamely vegyi anyag talajba való adszorbeálódásának folyamatában részt vevő számos jelenséget és mechanizmust nem lehet teljes mértékben meghatározni olyan egyszerűsített laboratóriumi modellel, mint ez a módszer. Azonban, még ha e kísérlet nem is tudja lefedni az összes, a környezetben előforduló esetet, elégséges tájékoztatást ad az adott vegyi anyag adszorpciójának környezeti jelentőségéről.

Lásd még az Általános bevezetést.

1.2. ALKALMAZÁSI KÖR

A módszer célja valamely anyag talajra vonatkozó adszorpciós/deszorpciós magatartásának a vizsgálata. A célkitűzés olyan szorpciós érték megállapítása, amelyet fel lehet használni a megoszlás előrejelzésére különféle környezeti feltételek között; e célból valamely vegyszer különféle talajokra vonatkozó egyensúlyi adszorpciós koefficiensét a talaj jellemzőinek (pl. szervesszén-tartalom, agyagtartalom, talajszerkezet és pH-érték) függvényeként határozzák meg. Különböző talajtípusokat kell felhasználni annak érdekében, hogy az adott anyag természetben előforduló talajokkal létrejövő kölcsönhatásait a lehető legszélesebb körben lefedjék.

E módszerben az adszorpció azt a folyamatot képviseli, amely keretében a vegyi anyag a talajszemcsék felületéhez kötődik; e módszer nem tesz különbséget a különféle adszorpciós folyamatok (fizikai és kémiai adszorpció), valamint olyan folyamatok között, mint felületkatalizált lebomlás, tömeges adszorpció vagy kémiai reakció. A talaj kolloid méretű szemcséin (átmérő < 0,2 μm) bekövetkező adszorpciót nem veszik figyelembe.

▼B

Az adszorpció szempontjából legfontosabbnak tartott talajparaméterek a következők: szervesszén-tartalom (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48); agyagtartalom és talajtextúra (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48), az ionizálható vegyületek esetében a pH-érték (3) (4) (42). Az adott anyag adszorpcióját/deszorpcióját esetleg befolyásoló egyéb talajparaméterek az effektív kationcserélő-kapacitás (ECEC), az amorf vas- és alumínium-oxid-tartalom, különösen vulkanikus és trópusi talajok esetében (4), valamint a talaj fajlagos felülete (49).

A vizsgálat kialakítása olyan, hogy eltérő szervesszén-tartalommal, agyagtartalommal és talajszerkezettel, valamint pH-értékkel rendelkező különböző talajtípusokban értékeli valamely vegyszer adszorpcióját. Három szintből épül fel:

1.**szint:** — a talaj/oldat arány,

— az adszorpciós egyensúly beálltáig eltelt idő és az egyensúlyi helyzetben a vizsgált anyagból adszorbeált mennyiség,

— a vizsgált anyag adszorpciója a tesztedények felületén, valamint a vizsgált anyag stabilitása a vizsgálat ideje alatt.

2.**szint:** „Screening” teszt: az adszorpciót öt különböző talajtípusban vizsgálják. Egyetlen koncentráció alkalmazásával vizsgálják az adszorpció kinetikáját, és meghatározzák a K_d és K_{oc} megoszlási együtthatókat.

3.**szint:** A Freundlich-féle adszorpciós izotermák meghatározása annak megállapítására, hogy a koncentráció hogyan befolyásolja az adszorpció mértékét.

Deszorpció tanulmányozása deszorpciós kinetika/Freundlich-féle deszorpciós izotermák segítségével (1. függelék).

1.3. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Jel	Fogalommeghatározás	Mértékegység
A_{t_i}	adszorpció mértéke t_i időpontban	%
A_{eq}	adszorpció mértéke adszorpciós egyensúly helyzetben	%
$m_s^{ads}(t_i)$	a vizsgált anyag talajban adszorbeált tömege t_i időpontban	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	a vizsgált anyag talajban adszorbeált tömege a A_{ti} időintervallumban	µg
$m_s^{ads}(eq)$	a vizsgált anyag talajban adszorbeált tömege adszorpciós egyensúlyi helyzetben	µg
m_0	a vizsgált anyag tömege a kémcsőben az adszorpciós vizsgálat kezdetén	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	a vizsgált anyag az analízisre kivett térfogatban (v_a^A) tömege a t_i időpontban	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	az anyag tömege a törzsoldatban adszorpciós egyensúlyi helyzetben	µg
M_{talaj}	a talajfázis mennyisége, talaj szárazanyagtartalomban kifejezve	g

▼B

Jel	Fogalommeghatározás	Mértékegység
C_{st}	az anyag oldott mennyiségének tömegkoncentrációja	μg cm^{-3}
C_0	a talajjal érintkezésben lévő vizsgált oldat kezdeti tömegkoncentrációja	μg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	az anyag tömegkoncentrációja a vizes fázisban abban a t_i időpontban, amikor az elemzést végzik	μg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	a talajban adszorbeált anyagtartalom adszorpciós egyensúlyi helyzetben	μg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	az anyag tömegkoncentrációja a vizes fázisban adszorpciós egyensúlyi helyzetben	μg cm^{-3}
V_0	a talajjal (az adszorpciós vizsgálat során) érintkező vizes fázis kezdeti térfogata	cm^3
v_a^A	a vizsgált anyag mérésére használt aliquota térfogata	cm^3
K_d	adszorpciós megoszlási koefficiens	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	szerves szénre vonatkoztatott adszorpciós koefficiens	cm^3 g^{-1}
K_{om}	szerves anyagra vonatkoztatott megoszlási koefficiens	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	Freundlich-féle adszorpciós koefficiens	μg $^{1-1/n}$ (cm^3)
1/n	Freundlich-féle exponens	
D_{t_i}	deszorpció mértéke a t_i időpontban	%
$D_{\Delta t_i}$	deszorpció mértéke a Δt_i időintervallumban	%
K_{des}	látszólagos deszorpciós koefficiens	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	Freundlich-féle deszorpciós koefficiens	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	a vizsgált anyag talajból deszorbeált tömege t_i időpontban	μg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	a vizsgált anyag talajból deszorbeált tömege Δt_i időintervallumban	μg
$m_m^{des}(eq)$	az anyag analitikus módon meghatározott tömege a vizes fázisban deszorpciós egyensúlyi helyzetben	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	a vizsgált anyag deszorbeált össztömege deszorpciós egyensúlyi helyzetben	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	az anyag talajban adszorbeálva maradó tömege At_i időintervallum után	μg
m_{aq}^A	a vizsgált anyagnak az abszorpciós egyensúlyi helyzet elérését követően a tökéletlen folyadékeltávolítás miatt talajban megmaradt tömege	μg
$C_s^{des}(eq)$	a talajban adszorbeálva maradó vizsgált anyag tartalom deszorpciós egyensúlyi helyzetben	μg g^{-1}

▼B

Jel	Fogalommeghatározás	Mértékegység
$C_{aq}^{des}(eq)$	a vizsgált anyag tömegkoncentrációja vizes fázisban deszorpciós egyensúlyi helyzetben	μg cm^{-3}
V_T	a talajjal érintkezésben lévő vizes fázis össztérfogata a „folytatásos” módszerrel végrehajtott deszorpciós kinetikai kísérlet során	cm^3
v_R	az adszorpciós egyensúlyi helyzet elérését követően a kémcsőből eltávolított és azonos térfogatú 0,01 M $CaCl_2$ oldattal pótolt vizes fázis mennyisége	cm^3
v_a^D	a kémcsőből (i) időpontban a vizsgált anyag analizálása céljából kiemelt aliquot minta térfogata a „folytatásos” módszerrel végzett deszorpciós kinetikai kísérletben	cm^3
V_r^i	az (i) kémcsőből a vizsgált anyag mérésére kiemelt oldat térfogata a párhuzamos módszerrel végzett deszorpciós kinetikai kísérletben	cm^3
V_r^F	a kémcsőből a vizsgált anyag mérésére kivett oldat térfogata deszorpciós egyensúlyi helyzetben	cm^3
MB	tömegkiegyenlítés	%
m_E	a talajból és a tesztedény faláról két lépésben extrahált vizsgált anyag össztömege	μg
V_{rec}	az adszorpciós egyensúlyi helyzet után visszanyert felülúszó térfogata	cm^3
P_{ow}	oktanol/víz megoszlási koefficiens	
pKa	disszociációs állandó	
S_w	vízoldhatóság	g l^{-1}

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A radioaktívan jelölt vagy nem jelölt tesztanyag ismert térfogatú és koncentrációjú, 0,01 M $CaCl_2$-ben készült oldatait 0,01 M $CaCl_2$-vel ekvilibrált, ismert száraz tömegű talajmintákhoz adják. A keveréket megfelelő ideig rázzák. A talajszuszpenziókat ezt követően centrifugálással és szükség esetén szűréssel elválasztják, és a vizes fázist elemzik. A talajmintában adszorbeálódott vizsgáltanyag-mennyiséget a kezdetben az oldatban jelen lévő vizsgált anyagmennyiség és a kísérlet végén fennmaradó mennyiség különbözeteként adják meg (közvetett módszer).

Másik lehetőségként a vizsgált anyag adszorbeálódott mennyiségét közvetlenül is meg lehet határozni a talaj elemzésével (közvetlen módszer). Ezen eljárást, amely magában foglalja a megfelelő oldószerrel lépésekben történő talajextrakciót, olyan esetekben ajánlják, ahol az anyag oldatkoncentrációjában beálló különbözetet nem lehet pontosan meghatározni. Ilyen esetek pl. a vizsgált anyag adszorpciója a kísérleti edény falán, a vizsgált anyag instabilitása a kísérlet ideje alatt, gyenge adszorpció, amely az oldatban csak kis koncentrációváltozást eredményez; és az alacsony koncentrációt eredményező erőteljes adszorpció, amelyet nem lehet pontosan meghatározni. Ha radioaktívként jelölt anyagot használnak, a talajextrakció elkerülhető, ha a talajmintát hevítik, és folyadékszcintillációs számlálással határozzák meg a tesztanyag mennyiségét. A folyadékszcintillációs számlálás azonban olyan nem specifikus eljárás, amely nem tud különbséget tenni a tesztanyag és az átalakulási termékei között; ezért csak akkor kell használni, ha a vizsgált vegyi anyag a vizsgálat tartama alatt stabil.

▼B

1.5. A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓ

Analitikai tisztaságú reagenseket kell használni. Ismert összetételű és lehetőleg legalább 95 % tisztaságú, jelöletlen vagy ismert összetételű, radioaktívként jelölt, radioaktivitás szempontjából is ismert tisztaságú vizsgált anyagok használata ajánlott. Rövid felezési idejű jelzők esetén bomlási korrekciókat kell alkalmazni.

Az adszorpciós-deszorpciós vizsgálat elvégzése előtt a vizsgált anyagról a következő információnak kell rendelkezésre állnia:

a) vízoldhatóság (A.6);

b) gőznyomás (A.4) és/vagy a Henry-törvény szerinti állandó;

c) abiotikus lebomlás: hidrolízis a pH függvényében (C.7);

d) megoszlási koefficiens (A.8);

e) gyors biológiai lebonthatóság (C.4) vagy az anyag aerob és anaerob transzformációja a talajban;

f) ionizálható anyagok pKa értéke;

g) közvetlen fotolízis vízben (azaz UV-VIS adszorbciós spektrum vízben, kvantumhozam) és fotodegradáció a talajban.

1.6. A VIZSGÁLAT ALKALMAZHATÓSÁGA

A vizsgálat olyan vegyi anyagokra alkalmazandó, amelyekre nézve kielégítő pontosságú analitikai módszer áll rendelkezésre. Az eredmények megbízhatóságát befolyásolni képes fontos tényező, különösen olyan esetben, amikor a közvetett módszert követik, a vizsgált anyag stabilitása a vizsgálat időtartama alatt. Ezért a stabilitást ellenőrizni kell előzetes vizsgálat során; ha az előkísérletben a teszt tervezett időtartama alatt átalakulást figyelnek meg az anyagon, akkor ajánlott a fő vizsgálatot a talaj- és vizes fázisok mindegyikének elemzésével elvégezni.

E vizsgálat végrehajtása során vízben csak kevéssé oldódó vizsgált anyagok ($Sw< 10\text{-}4\ g\ l^{-1}$), valamint erős töltéssel rendelkező anyagok esetében nehézségek merülhetnek fel amiatt, hogy a vizes fázisban a koncentrációt analitikai módszerekkel nem lehet megfelelő pontossággal mérni. Ilyen esetekben további lépéseket kell tenni. E jogszabály vonatkozó szakaszai iránymutatást nyújtanak az ilyen problémák kezeléséhez.

Illékony anyagok vizsgálata során ügyelni kell a veszteségek elkerülésére.

1.7. A MÓDSZER LEÍRÁSA

1.7.1. **Eszközök és reagensek**

Szabványos laboratóriumi felszerelés, különösen a következők:

a) Kémcsövek vagy edények a kísérletek végzéséhez. Fontos, hogy e kémcsövek vagy edények:

— pontosan illeszkedjenek a centrifugába, a kezelési és áthelyezési hibák minimalizálása érdekében,

— közömbös (inert) anyagból készüljenek, ami minimálisra csökkenti a felületükön a vizsgálat anyag adszorpcióját.

▼B

b) Rázókészülék: körforgó rázógép vagy ezzel egyenértékű berendezés; a készülék a rázatás során tartsa szuszpenzióban a talajt.

c) Centrifuga: lehetőleg nagy sebességű, pl. centrifugálás erő > 3 000 g, hőszabályozós, illetve legyen képes a vizes oldatokból eltávolítani a 0,2 μm-nél nagyobb átmérőjű szemcséket. A rázatás és centrifugálás során a tesztedényeket le kell fedni a párolgás és a vízveszteség elkerülése érdekében; az ezeken jelentkező adszorpció minimalizálása érdekében deaktivált felszínű, mint pl. teflonbevonatú csavaros tetőt kell alkalmazni.

d) Szabadon választható: szűrőberendezés; 0,2 μm pórusméretű, steril, egyszer használatos filterekkel. Különös gonddal kell eljárni a filterek anyagának kiválasztásakor annak érdekében, hogy elkerüljék a vizsgált anyag bármilyen veszteségét ezeken; a rosszul oldódó vizsgált anyagok esetében nem ajánlatos szerves szűrőanyagot használni.

e) Analitikai berendezések, amelyek alkalmasak a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának mérésére.

f) Laboratóriumi szárítószekrény, amely 103 °C és 110 °C közötti hőmérsékletet tud tartani.

1.7.2. **Talajok jellemzése és kiválasztása**

A talajokat három olyan paraméterrel kell jellemezni, amelyeket nagyrészt felelősnek tartanak az adszorpcióért: szervesszén-tartalom, agyagtartalom és talajszerkezet, valamint a pH-érték. Mint az már korábban szerepelt (lásd Alkalmazási kör), a talaj más fizikai-kémiai tulajdonságai befolyásolhatják egy adott anyag adszorpcióját/deszorpcióját, ilyen esetekben azokat is figyelembe kell venni.

A talaj jellemzésére használt módszerek nagyon fontosak, és jelentősen befolyásolhatják az eredményeket. Ezért ajánlatos a talaj pH-értékét 0,01 M $CaCl_2$-oldatban mérni (ez az adszorpciós/deszorpciós vizsgálatban használt oldat) a megfelelő ISO-módszer szerint (ISO-10390-1). Ajánlott továbbá az egyéb jelentős talajtulajdonságok szabványmódszer szerinti meghatározása (pl. az ISO „Talajanalízis kézikönyv” szerint); amely lehetővé teszi, hogy a szorpciós adatok nemzetközileg egységes, szabványosított talaj paramétereken alapuljanak. A talaj elemzésére és jellemzésére rendelkezésre álló szabványmódszerekre vonatkozó iránymutatás megtalálható a szakirodalomban (50-52). A talajvizsgálati módszerek kalibrálásához ajánlott referenciatalajokat használni.

Az adszorpciós/deszorpciós kísérletekhez használt talajok kiválasztására vonatkozó iránymutatás az 1. táblázatban szerepel. A hét kiválasztott talaj lefedi a mérsékelt égövben megtalálható talajtípusokat. Az ionizálható vizsgált anyagok esetében a kiválasztott talajoknak széles pH-érték tartományt kell lefedniük ahhoz, hogy értékelni lehessen az anyag adszorpcióját ionizált és nem ionizált formában is. Arra nézve, hogy a vizsgálat különféle szakaszaiban hány különböző talajt kell használni, „A vizsgálat végrehajtása” című szakasz (1.9.) nyújt iránymutatást.

Ha egyéb talajtípusokat részesítenek előnyben, ezeket ugyanezekkel a paraméterekkel kell jellemezni és azok tulajdonságainak hasonló eltérést kell mutatnia, mint az 1. táblázatban ismertetettek, még akkor is, ha nem pontosan felelnek meg a kritériumoknak.

▼B

1. táblázat

Adszorpcióhoz-deszorpcióhoz használt talajminták kiválasztására vonatkozó iránymutatás

Talajtípus	pH-tartomany (0,01 M $CaCl_2$ oldatban)	Szervesszén-tartalom (%)	Agyagtartalom (%)	Talaj textúrája ([1])
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65–80	agyagos talaj
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20–40	agyagos vályogtalaj
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15–25	iszapos vályogtalaj
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15–30	vályogtalaj
5	< 4,0 - 6,0 ([2])	< 0,5 - 1,5 ([2]) ([3])	< 10–15 ([2])	vályogos homoktalaj
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 ([2]) ([3])	40–65	agyagos vályogtalaj/ agyagos talaj
7	< 4,5	> 10	< 10	homoktalaj/vályogos homoktalaj

([1]) A FAO és az US-rendszer szerint (85).
([2]) A vonatkozó változók lehetőleg a megadott tartományon belüli értékeket mutassanak. Ha azonban nehézségek merülnek fel a megfelelő talajanyag megtalálásában, elfogadhatóak a jelzett minimum alatti értékek is.
([3]) A 0,3 %-nál kisebb szervesszén-tartalmú talajok megzavarhatják a szervesanyag-tartalom és az adszorpció közötti összefüggést. Így ajánlatos legalább 0,3 % szervesszén-tartalmú talajokat használni.

1.7.3. **Talajminták gyűjtése és tárolása**

1.7.3.1. *Gyűjtés*

Nincs konkrét ajánlott mintavételi eljárás vagy eszköz; a mintavételi technika a vizsgálat céljától függ (53) (54) (55) (56) (57) (58).

A következőket kell figyelembe venni:

a) szükség van a terep „előéletére” vonatkozó részletes információra; ez magában foglalja a terepelhelyezkedést, a növényzetet, a peszticidekkel és/vagy trágyákkal történt kezeléseket, biológiai utánpótlását vagy véletlen szennyeződéseket. A mintavételre vonatkozó ISO-szabvány (ISO 10381-6) ajánlásait kell követni a mintavételi helyszín leírása tekintetében;

b) a mintavételi helyszínt az UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) vagy földrajzi koordináták segítségével kell meghatározni; ez lehetővé teszi ugyanazon talajtípus újbóli gyűjtését a jövőben, vagy segítséget tud nyújtani a különböző országokban használt különféle besorolási rendszerek szerinti talaj meghatározásban. Az A. szintből, legfeljebb 20 cm mélységből kell a talajmintát begyűjteni. Különösen a hetedik talajtípus esetében, ha a talaj részeként egy Oh-szint is jelen van, annak szerepelnie kell a mintában.

A talajmintákat olyan konténerek felhasználásával és olyan hőmérsékleti viszonyok között kell szállítani, amelyek garantálják, hogy az eredeti talajtulajdonságok jelentősen nem változnak meg.

▼B

1.7.3.2. *Tárolás*

Előnyben részesül a terepről frissen vett talajok használata. Csak amennyiben ez nem lehetséges, akkor lehet a talajt szobahőmérsékleten, levegőn szárított állapotban tárolni. A tárolás idejére nézve nincs ajánlott határérték, de a három évnél tovább tárolt talajokat felhasználás előtt újra kell elemezni szervesszén-tartalmuk, pH-értékük és a CEC tekintetében.

1.7.3.3. *Talajminták kezelése és előkészítése a vizsgálathoz*

A talajmintákat szobahőmérsékleten (lehetőleg 20–25 ^{o}C között) levegőn szárítják. A fellazítást minimális erőkifejtéssel kell végezni, hogy a talaj eredeti textúrája a lehető legkisebb mértékben változzon. A talajokat < 2 mm részecskeméretre szitálják; a szitálási folyamat tekintetében a talajmintavételre vonatkozó ISO-szabvány (ISO 10381-6) ajánlásait kell követni. Ajánlatos a gondos homogenizálás, mivel ez lehetővé teszi az eredmények megismételhetőségét. A talajok nedvességtartalmát a talajból vett három mintából határozzák meg. A három mintát 105 ^{o}C-on, tömegállandóságig (kb. 12 órán át) szárítják. A talaj tömege minden számításnál a száraz tömeg, azaz a talaj nedvességtartalommal korrigált súlya.

1.7.4. **A vizsgált anyag előkészítése a talajra történő alkalmazáshoz**

A vizsgált anyagot desztillált vagy deionizált vizes 0,01 M $CaCl_2$-oldatban feloldják; a $CaCl_2$-oldatot a centrifugálás javítása és a kationcsere minimalizálása érdekében a vizes oldatfázisként alkalmazzák. A törzsoldat koncentrációja lehetőleg legyen három nagyságrenddel nagyobb, mint az alkalmazott elemzési módszer kimutatási határa. Ez a küszöbérték biztosítja a pontos méréseket az e módszer alapjául szolgáló módszer vonatkozásában; ezenkívül a törzsoldat koncentrációja lehetőleg ne érje el a vizsgált anyag vízoldhatósági határát.

A törzsoldatot lehetőleg közvetlenül a talajmintákra történő felvitelt megelőzően kell előkészíteni, és sötét, elzárt helyen 4 ^{o}C hőmérsékleten kell tárolni. A tárolási idő a vizsgált anyag stabilitásától és oldatbeli koncentrációjától függ.

Csak a nehezen oldható anyagok (Sw < 10-4 g l^{-1}) esetében lehet szükség oldást segítő anyagra. Ez az oldódást segítő anyag: a) legyen vízzel elegyedő, mint a metanol vagy az acetonitril; b) koncentrációja ne haladja meg a törzsoldat teljes térfogatának 1 %-át, és legyen ennél kevesebb a vizsgált anyag azon oldatában, amely érintkezésbe kerül a talajjal (lehetőleg legyen 0,1 %-nál kevesebb); és c) ne legyen felületaktív anyag, és ne lépjen vegyületképző reakcióba a vizsgált vegyi anyaggal. Az oldást segítő anyag használatát a vizsgálati jelentésben ismertetni kell és meg is kell indokolni.

A nehezen oldható anyagok esetében alkalmazható másik módszer az, hogy szerves oldószerben feloldott tesztanyagot adnak a talajból és a (desztillált vagy ionmentes vízzel készült) 0,01 M $CaCl_2$-oldatból álló tesztrendszerhez („spiking”). A vizes fázisban a szerves oldószer tartalmát a lehető legalacsonyabb szinten kell tartani, általában a 0,1 % értéket nem meghaladva. A szerves oldattal történő elegyítés következménye, hogy a térfogat ezután már nem reprodukálható. Így további hiba állhat elő, mivel a vizsgált anyag és az oldószer koncentrációja nem azonos az összes vizsgálatban.

▼B

1.8. AZ ADSZORPCIÓS/DESZORPCIÓS KÍSÉRLET ELVÉGZÉSÉNEK ELŐFELTÉTELEI

1.8.1. **Elemzési módszer**

A szorpciós mérések pontosságát befolyásolni képes kulcsfontosságú paraméterek a következőek: az elemzési módszer pontossága az oldat és az adszorbeált fázisok elemzése során, a vizsgált anyag stabilitása és tisztasága, az adszorpciós egyensúlyi helyzet elérése, az oldatkoncentráció változásának mértéke, a talaj/oldat arány és az egyensúlyi folyamat beállítása során a talajszerkezet változásai (35) (59–62). A pontosság kérdésében szerepet játszó néhány példát a 2. függelék tartalmazza.

Az alkalmazott elemzési módszer megbízhatóságát annál a koncentrációtartománynál kell ellenőrizni, amely a vizsgálat során valószínűleg felmerül. A kísérletet végző belátása szerint kialakíthat megfelelő módszert a megfelelő pontossággal, precizitással, reprodukálhatósággal, kimutatási határértékkel és visszanyerési hatékonysággal. Az ilyen vizsgálatok elvégzésének módjára vonatkozóan iránymutatást ad az alábbi kísérlet.

0,01 M $CaCl_2$ megfelelő mennyiségét, pl. 100 cm^3-t, 4 órán át rázatunk pl. 20 g tömegű, nagy adszorpciós kapacitással rendelkező talajjal, azaz olyannal, amelynek magas a szervesszén- és agyagtartalma; e tömeg és térfogat az elemzési igénytől függően változhat, de az 1:5 talaj/oldat arány a megfelelő kiindulási pont. A keveréket centrifugáljuk, és a vizes fázist szűrni lehet. A vizsgált anyag törzsoldatának megfelelő mennyiségét hozzáadjuk a megszűrt keverékhez, azért, hogy a vizsgálat során valószínűleg bekövetkező koncentrációtartományba eső névleges koncentrációt érjük el. E mennyiség ne haladja meg a vizes fázis végleges térfogatának 10 %-át, hogy a preekvilibrációs oldat jellegét a lehető legkevésbé változtassuk meg. Az oldatot elemezzük.

Egy talajból és $CaCl_2$-oldatból (vizsgált anyag nélkül) álló vakpróbát is be kell állítani az analitikai módszer műhibáinak kiszűrése és a talaj által okozott mátrixhatás ellenőrzése céljából.

A szorpciós mérésekre alkalmazható elemzési módszerek közé tartozik a gáz-folyadék kromatográfia (GLC), a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), a tömegspektrometria (pl. GC-MS, HPLC-MS) és a folyadékszcintillációs számlálás (radioaktívként jelölt anyagok esetén). Az alkalmazott elemzési módszertől függetlenül az minősül alkalmasnak, amelynél a visszanyerés a névérték 90 %-a és 110 %-a között van. A megoszlás után a kimutatás és értékelés lehetővé tétele érdekében az elemzési módszer kimutatási határértékeinek legalább két nagyságrenddel a névleges koncentráció alatt kell lenniük.

Az adszorpciós vizsgálatok elvégzéséhez rendelkezésre álló elemzési módszerek jellemzői és dedikálási határa fontos szerepet játszanak a vizsgálati körülmények meghatározásában és a vizsgálat kivitelezésében. E módszer egy általános vizsgálati eljárást követ és ajánlásokat, iránymutatásokat ad alternatív megoldásokra olyan esetekben, ahol az elemzési módszer és a laboratóriumi felszerelés korlátokat állíthat.

▼B

1.8.2. **Az optimális talaj/oldat arányok kiválasztása**

A szorpciós vizsgálatokhoz a megfelelő talaj-oldat arány kiválasztása a K_d megoszlási koefficienstől és az adszorpció kívánt relatív fokától függ. Az anyag koncentrációjának változása az oldatban, az adszorpciós egyenlet formája és az elemzési módszer detektálási határa meghatározza a mérés statisztikus pontosságát a vegyszer oldatbeli koncentrációjának kimutatásában. Ezért általában a gyakorlatban hasznos néhány előre meghatározott arányt beállítani, amelyeknél az adszorbeált százalékos arány 20 % felett van, és lehetőleg > 50 % (62), ugyanakkor figyelmet kell fordítani arra, hogy a vizes fázisban a vizsgált anyag koncentrációja elég magas maradjon ahhoz, hogy pontosan lehessen mérni. Ez különösen a nagy adszorpciós arányok esetében fontos.

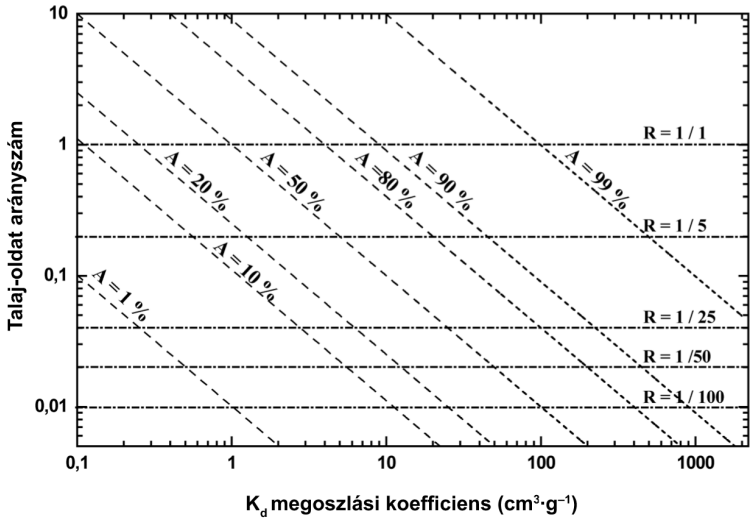
A megfelelő talaj/oldat arányok kiválasztásához kézenfekvő megközelítés a K_d érték becslésén alapul, amelyet vagy elővizsgálatok, vagy bevett becslési technikák segítségével (3. függelék) határoznak meg. A megfelelő arány ezután kiválasztható egy olyan grafikon segítségével, amely a meghatározott adszorpciós százalékokra vonatkozó talaj/oldat arányt a K_d függvényében ábrázolja (1. ábra). Ekkor az a feltételezés, hogy az adszorpciós egyenlet lineáris ([1]) (6). Az alkalmazandó összefüggést úgy kapják meg, ha a K_d-re vonatkozó 4. egyenletet az 1. egyenlet alakjára hozzák:

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

vagy logaritmusos formában fejezik ki, feltéve hogy

$R = m_{talaj}/V0$ and $A_{eq}\,\%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{A_{eq}\%/100}{1 - A_{eq}\%/100}\right] \qquad (2)$$



1. ábra: A talaj-oldat arányszámok és a K_d közötti reláció az adszorbeált vizsgált anyag különböző százalékos mértékeinél

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$

▼B

Az 1. ábra a különböző adszorpciós szintekhez szükséges talaj/oldat arányszámokat mutatja a K_d függvényeként. Pl. egy 1:5 talaj/oldat aránnyal és K_d = 20 érték mellett kb. 80 % adszorpció következik be. Ugyanezen K_d mellett 50 %-os adszorpció eléréséhez 1:25 arányt kell alkalmazni. E rugalmas megközelítéssel választhatja ki a kísérletet végző a kísérlet céljainak leginkább megfelelő talaj/oldat arányt.

Nagyobb nehézségek adódnak azokban a tartományokban, ahol a vegyszer nagyon erősen vagy csak nagyon kis mértékben adszorbeálódik. Abban az esetben, ha alacsony szintű adszorpció következik be, 1:1 talaj/oldat arány ajánlott, bár néhány nagy szervesanyagtartalmú talajfajtánál bizonyos körülmények között kisebb arányra lehet szükség a sűrű szuszpenzió eléréséhez. Az oldat koncentrációjának kis változását mérő elemzési módszertannal kapcsolatban gondosan kell eljárni; különben az adszorpciós mérés pontatlan lesz. Másrészről nagyon magas K_d megoszlási koefficiensnél akár 1:100 talaj/oldat arányig is el lehet menni ahhoz, hogy jelentős mennyiségű tesztanyag maradjon az oldatban. Gondot kell azonban fordítani az alapos keverésre, és megfelelő időt kell hagyni a rendszernek az egyensúlyi állapot eléréséhez. Az ilyen szélsőséges esetek kezelésének másik megközelítése, ha a megfelelő elemzési módszertan hiányzik, a K_d érték előrejelzése pl. a P_{ow} értékeken alapuló becslési technikákkal (3. függelék). Ez az eljárás különösen hasznos lehet kevéssé adszorbeálódó/poláros vegyszerek esetén, amelyeknél $P_{ow} < 20$, valamint a lipofil/nagy abszorpcióképességű vegyszerek esetén, amelyeknél $P_{ow} > 104$.

1.9. A VIZSGÁLAT VÉGREHAJTÁSA

1.9.1. **Vizsgálati körülmények**

Minden kísérletet szobahőmérsékleten és – ha lehetséges – 20 °C és 25 °C közötti állandó hőmérsékleten végeznek el.

A centrifugálási feltételeknek lehetővé kell tennie a 0,2 μm-nél nagyobb részecskék kiülepedését az oldatból. Ez az érték a legkisebb méretű olyan részecskékre vonatkozik, amelyek még szilárd részecskéknek minősülnek, és ez a határérték a szilárd és kolloid részecskék között. A centrifugálási feltételek meghatározására vonatkozó iránymutatás a 4. függelékben szerepel.

Ha a centrifugálóberendezés nem tudja garantálni a 0,2 μm-nél nagyobb részecskék ülepítését, akkor alkalmazni lehet a centrifugálás és 0,2 μm-es pórusméretű filterrel történő szűrés kombinációját. Ezeket a szűrőket alkalmas inert anyagból kell készíteni, hogy el lehessen kerülni a szűrés folyamán bekövetkező veszteségét. Minden esetben bizonyítani kell, hogy a szűrés során nem következik be a vizsgált anyag vesztesége.

1.9.2. **1. szint – előzetes vizsgálat**

Az előzetes vizsgálat elvégzésének célját már meghatározta az Alkalmazási kör című szakasz. Az ilyen vizsgálat összeállítására vonatkozó iránymutatást az alább javasolt kísérlet adja meg.

1.9.2.1. *Optimális talaj/oldat arányok kiválasztása*

Két talajtípust és három talaj/oldat arányt használnak (hat kísérlet). Az egyik talajtípus magas szervesszén- és alacsony agyagtartalommal rendelkezik, a másik pedig alacsony szervesszén-és magas agyagtartalommal. A következő talaj-oldat arányok használata javasolt:

— 50 g talaj és a vizsgált anyag vizes oldatának 50 cm^3 mennyisége (1:1 arány),

▼B

— 10 g talaj és a vizsgált anyag vizes oldatának 50 cm^3 mennyisége (1:5 arány),

— 2 g talaj és a vizsgált anyag vizes oldatának 50 cm^3 mennyisége (1:25 arány).

A minimális talajmennyiség, amellyel a kísérletet el lehet végezni, a laboratóriumi eszközöktől és az alkalmazott elemzési módszerek teljesítőképességétől függ. Ajánlatos legalább 1 g használata, előnyösebb azonban a 2 g a vizsgálat megbízható eredményeinek biztosítására.

Egy kontrollmintát, amely csak a vizsgált anyag 0,01 M $CaCl_2$-oldatát tartalmazza (talajt nem), pontosan ugyanazoknak a lépéseknek kell alávetnünk, mint a vizsgálati rendszereket, annak érdekében, hogy ellenőrizni lehessen a vizsgált anyag stabilitását $CaCl_2$-oldatban és annak esetleges adszorpcióját a tesztedények falán.

Talajmintánként elvégeznek egy vakpróbát, amely során azonos mennyiségű talajt és 50 cm^3 0,01 M $CaCl_2$-oldatot (vizsgált anyag nélkül) pontosan ugyanazoknak a lépéseknek vetnek alá, mint a vizsgálati rendszereket. Ez háttérkontrollként szolgál az elemzés során az interferáló anyagok vagy szennyezett talajok kiszűrésére.

Minden kísérletet, beleértve a kontroll és vak kísérleteket, legalább kétszer kell elvégezni. A vizsgálathoz összesen előkészítendő minták számát az alapul szolgáló módszertan segítségével lehet kiszámítani.

Az előzetes vizsgálat és a fő vizsgálat módszerei általában azonosak, a kivételeket megemlítjük, ahol ez jelentőséggel bír.

A levegőn szárított talajmintákat rázással hozzuk egyensúlyi helyzetbe, legalább 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$-oldattal, a kísérlet napja előtti éjszakán (12 órával előbb). Ezt követően a vizsgált anyag törzsoldatának megfelelő mennyiségét hozzáadják, azért hogy a végleges térfogat 50 cm^3 legyen. A törzsoldat így hozzáadott mennyisége: a) nem haladhatja meg az 50 cm^3-es végtérfogat 10 %-át, hogy a lehető legkevésbé változtassa meg az egyensúlyba hozatal előtt az oldat jellegét; és b) lehetőleg az elemzési módszer kimutatási határértékénél legalább két nagyságrenddel nagyobb kiindulási koncentrációt eredményezzen a talajjal érintkező vizsgált anyag kiindulási koncentrációjában (C_0); ez a küszöb lehetővé teszi a pontos méréseket még akkor is, ha erőteljes adszorpció (> 90 %) következik be, valamint az adszorpciós izotermák későbbi meghatározását. Ajánlatos továbbá, hogy az anyag kiindulási koncentrációja (C_0) lehetőleg ne haladja meg az anyag oldhatósági határának felét.

Az alábbiakban bemutatnak egy példát a törzsoldat (C_{st}) koncentrációjának kiszámítására. Feltételeznek 0,01 μg cm^{-3} kimutatási határértéket és 90 % adszorpciót; így a vizsgált anyag talajjal érintkező kiindulási koncentrációja lehetőleg 1 μg cm^{-3} (a kimutatási határértéknél két nagyságrenddel nagyobb). Feltéve, hogy a törzsoldatból a rendszerhez a maximális ajánlott mennyiséget hozzáadják, azaz 5 cm^3-t a 45 cm^3 térfogatú 0,01 M $CaCl_2$ ekvilibrációs oldathoz (a törzsoldat így a vizes fázis 50 cm^3-es végtérfogatának 10 %-a), akkor a tömény oldat koncentrációja 10 μg cm^{-3} kell hogy legyen; ami három nagyságrenddel nagyobb, mint az elemzési módszer kimutatási határértéke.

A talajjal történő érintkezés előtt és után is meg kell mérni a vizes fázis pH-értékét, mivel ez fontos szerepet játszik a teljes adszorpciós folyamatban, különösen ionizálható anyagok esetén.

▼B

A keveréket addig rázzák, amíg eléri az adszorpciós egyensúlyi helyzetet. Az egyensúlyi helyzet elérésének ideje a talajokban igen változatos, a vegyi anyagtól és a talajtól is függ; 24 órás időszak általában elégséges (77). Az előzetes vizsgálatok végzésekor, a 48 órás rázatás során többször mintát vesznek (pl. 4., 8., 24. és 48. órában). Az elemzési időket rugalmasan kell kialakítani, a laboratórium munkarendjére tekintettel.

A vizsgált anyag vizes oldatában történő elemzésére két lehetőség van: a) párhuzamos módszer; és b) a „folytatásos” módszer. Hangsúlyozni kell, hogy bár a párhuzamos módszer alkalmazása időigényesebb, az eredmények matematikai feldolgozása egyszerűbb (5. függelék). A követendő módszer kiválasztását azonban a kísérletet végzőre hagyják, akinek figyelembe kell vennie a rendelkezésre álló laboratóriumi felszereléseket és eszközöket.

a) párhuzamos módszer: azonos talaj/oldat arányú mintákat készítenek elő, annyit, ahány időintervallumnál az adszorpciós kinetikát tanulmányozni kívánják. A centrifugálás, és amennyiben szükséges, szűrés után az első kémcső vizes fázisát a lehető legteljesebben visszaállítják és megmérik, pl. 4 óra után, a második kémcső esetében 8 óra után, a harmadik kémcső esetében 24 óra után stb.

b) „folytatásos” módszer: mindegyik talaj/oldat arányhoz csak két minta készül. Meghatározott időközönként a keveréket centrifugálják a fázisok szétválasztása érdekében. A vizes fázisból kivett kis mennyiségű oldat tesztanyagtartalmát azonnal meghatározzák; ezt követően a kísérlet az eredeti keverékkel folytatódik. Ha a centrifugálás után szűrést is alkalmaznak, a laboratóriumban lennie kell olyan berendezésnek, amely a kis térfogatok szűrésére alkalmas. Ajánlatos az analízisre kivett mennyiségek össztérfogatát úgy meghatározni, hogy az ne haladja meg az oldat teljes térfogatának 1 %-át, hogy a talaj/oldat arány jelentősen ne változzon és a vizsgálat során az adszorpcióra rendelkezésre álló oldott anyag tömege ne csökkenjen.

A százalékos adszorpciót (A_{t_i}) minden (t_i) időpontban kiszámítják a névleges kezdeti koncentráció és a mintavétel t_i időpontjában mért koncentráció alapján, amelyet a vakminta kapott értékével korrigálunk. Elkészítik az A_{t_i} érték időfüggését ábrázoló görbét (5. függelék 1. ábra) az adszorpciós egyensúlyi plató elérésének megbecslése érdekében ([1]). Kiszámítják az egyensúlyi K_d értéket is. E K_d érték alapján az 1. ábráról kiválasztják a megfelelő talaj/oldat arányokat úgy, hogy az adszorpció elérje a 20 % feletti és lehetőleg > 50 % mértéket (61). Minden vonatkozó egyenletet és ábrázolási alapelvet tartalmaz az adatokról és jelentéskészítésről szóló szakasz és az 5. függelék.

1.9.2.2. *Adszorpciós ekvilibrációs idő és az egyensúlyi helyzetben adszorbeált vizsgált anyag mennyiségének meghatározása*

Mint már említésre került, az A_{t_i} vagy C_{aq}^{ads} idő függvényében történő ábrázolása lehetővé teszi az adszorpciós egyensúlyi plató elérésének és az egyensúlyi állapotban adszorbeált vizsgált anyag mennyiségének becslését. Az 5. függelék 1. és 2. ábrája példákat mutat az ilyen grafikai ábrázolásra. Az ekvilibrációs időnek azon időszakot nevezik, amelyre a rendszernek a plató eléréséhez szüksége van.

([1]) A vizes fázisban lévő vizsgált anyag koncentrációját (C_{aq}^{ads}) az idő függvényében ábrázoló grafikonok is használhatók az egyensúlyi plató elérésének megbecslésére (lásd 5. függelék 2. ábra).

▼B

Ha egy adott talaj esetében nem plató, hanem folyamatos növekedés észlelhető, ez olyan tényezők miatt lehet, mint a biodegradáció vagy lassú diffúzió. A biodegradációt úgy lehet kimutatni, hogy a kísérletet a talaj sterilizált mintájával megismételjük. Ha még ebben az esetben sem jön létre a plató, a kísérletet végzőnek más jelenségeket kell keresnie, amelyek a konkrét vizsgálatban szerepet játszhatnak; ezt a kísérleti feltételek (hőmérséklet, rázási idő, talaj/oldat arányok) megfelelő módosításával lehet elvégezni. A kísérletet végzőre hárul annak eldöntése, hogy a vizsgálati eljárást folytatja-e annak dacára, hogy esetleg nem sikerül egyensúlyi állapotot elérni.

1.9.2.3. *Adszorpció a tesztedény falán és a vizsgált anyag stabilitása*

A kontrollminták elemzésével bizonyos információkat lehet nyerni a vizsgált anyagnak a tesztedény falán történő adszorpciójáról, valamint annak stabilitásáról. Ha az elemzési módszer standard eltérését meghaladó koncentrációcsökkenést figyelnek meg, felmerülhet az abiotikus bomlás és/vagy adszorpció a tesztedény falán. E két jelenséget úgy lehet megkülönböztetni, hogy alaposan lemossák a tartály falát megfelelő oldószer ismert térfogatával, és a nyert oldat tesztanyagtartalmát meghatározzák. Ha a tesztedény falán nem figyelnek meg adszorpciót, a koncentrációcsökkenés a vizsgált anyag abiotikus instabilitását mutatja. Ha adszorpciót észlelnek, a tesztet más anyagból készült edényben kell kivitelezni. Az e kísérletből adódó, a tesztedények falán történő adszorpcióra vonatkozó adatokat azonban nem lehet közvetlenül kivetíteni a talaj/oldat kísérletre. A talaj jelenléte is befolyásolja ezen adszorpciót.

A vizsgált anyag stabilitására vonatkozó további információt az anyag tömegegyensúlyának az idő függvényében történő meghatározásával lehet nyerni. Ez azt jelenti, hogy a vizes fázist, a talajt és a tesztedény falait a vizsgált anyagra nézve elemzik. A hozzáadott vizsgált tesztanyagtömege és a vizsgált vegyi anyag vizes fázisú tömegének, a talaj kivonatoknak és a tesztedény falain adszorbeált anyag tömegének összege közötti különbözet a lebomlott, elpárolgott, illetve a nem extrahált tömeggel egyenlő. A tömegegyensúly meghatározásának elvégzéséhez az szükséges, hogy a kísérlet időtartama alatt megvalósuljon az adszorbciós egyensúlyi helyzet.

A tömegegyensúlyt mindkét talaj esetében talajonként egyetlen olyan talaj/oldat arány esetében határozzák meg, amikor a tesztanyag mennyiségének csökkenése 20 % feletti, illetve lehetőleg 50 % feletti az egyensúlyi állapotban. Amikor a talaj/oldat arány meghatározására irányuló vizsgálatban az utolsó vizesfázis-minta analízisét 48 óra után befejezik, a fázisokat centrifugálással, és ha szükséges, szűréssel szétválasztják. A vizes fázist a lehető legnagyobb mértékben eltávolítják, és a vizsgált anyag extrahálása érdekében megfelelő extraháló oldószert (legalább 95 % extrakciós együttható) adnak a talajhoz. Legalább két egymást követő extrahálás ajánlott. Meghatározzák a talajban és a tesztedények falán extraktumokban lévő vizsgáltanyagmennyiséget és kiszámítják a tömegegyensúlyt (10. egyenlet, Adatok és jelentéskészítés). Ha ez 90 %-nál kevesebb, a vizsgált anyag a vizsgálat időtartamára nézve instabilnak minősül. A vizsgálatot azonban a vizsgált anyag instabilitásának figyelembevételével folytatni lehet; ebben az esetben ajánlatos a fő vizsgálat során mindkét fázis elemzése.

▼B

1.9.2.4. *2. szint – Adszorpciós kinetika a vizsgált anyag egyetlen koncentrációjánál*

Öt, az 1. táblázatból kiválasztott talajt használnak. Az előzetes vizsgálatban használt egy vagy több talaj alkalmazása előnyös. Ebben az esetben a 2. szintet nem kell megismételni az előzetes vizsgálatban használt talajokra nézve.

Az ekvilibrációs időt, a talaj/oldat arányt, a bemérendő talaj tömegét, a vizes fázis talajjal érintkező térfogatát és a vizsgált anyag koncentrációját az oldatban az előzetes vizsgálat eredményei alapján választják ki. Az elemzést lehetőleg kb. 2, 4, 6, 8 (esetleg 10) és 24 órás kezelést követően kell elvégezni; a rázási időt legfeljebb 48 órára meg lehet hosszabbítani, amennyiben a megfelelő talaj/oldat arány meghatározására irányuló vizsgálatok alapján hosszabb ekvilibrációs időre van szükség. Az elemzés időpontjait azonban rugalmasan lehet kezelni.

Mindegyik kísérletet (egy talaj és egy oldat) legalább kétszer kell elvégezni, hogy elemezni lehessen az eredmények varienciáját. Minden kísérletnél egy vakpróbát is végeznek. Ez a talajból és 0,01 M $CaCl_2$-oldatból áll, amely vizsgált anyagot nem tartalmaz, és tömegét és térfogatát tekintve megegyezik a kísérletben alkalmazottakkal. A nem várt tényezők kiszűrésére ugyanazon vizsgálati eljárásnak vetik alá az ellenőrző mintát is, amely csak a vizsgált anyagot tartalmazza 0,01 M $CaCl_2$-oldatban (talaj nélkül).

Mindegyik A_{t_i} időpontban vagy $A_{\Delta t_i}$ időintervallumban (a követelményeknek megfelelően) kiszámítják a százalékos adszorpciót és az idő függvényében ábrázolják. Kiszámítják továbbá az egyensúlyi deszorpciós együtthatót (K_d), valamint a szerves szénre vonatkoztatott adszorpciós együtthatót (K_{oc}) (apoláros szerves vegyületekre).

Az adszorpciós kinetikai vizsgálat eredményei:

A lineáris K_d-érték általában pontosan írja le egy anyag szorpciós tulajdonságait (35), (78) és kifejezi a talajban található vegyszerek jellemző mobilitását. Például általában a $K_d < 1$ cm^3 g^{-1} jellemzőjű vegyszerek kvalitatívan mobilnak minősülnek. Hasonló, a K_{oc}-értékeken alapuló mobilitási besorolási rendszert dolgoztak ki MacCall és munkatársai (16). Ezenkívül a K_{oc} és DT-50 ([1]) közötti viszony alapján ki oldódási besorolási rendszerek is léteznek (32) (79).

Az eltérések analízise szerint továbbá (61) a 0,3 cm^3 g-l alatti K_d értékeket nem lehet pontosan becsülni a vizes fázisban a koncentráció csökkenése alapján, még a (pontosság szempontjából) legkedvezőbb talaj/oldat arány, azaz az 1:1 arány alkalmazásánál sem. Ebben az esetben ajánlatos mindkét fázis – talaj és oldat – elemzése.

([1]) DT_{50}: a vizsgált anyag 50 %-ának lebomlási ideje.

▼B

A fenti megállapításokra tekintettel ajánlatos valamely anyag talajban tanúsított adszorpciós viselkedésére és mobilitási potenciáljára irányuló vizsgálatot lefolytatni, amely során az adszorpciós izotermákat Freundlich elmélete szerint határozzák meg. Ehhez pedig – ha a tesztmódszerben megjelölt vizsgálati eljárást alkalmazzuk –, a K_d értéke pontosan meghatározható. A pontos meghatározás akkor lehetséges, ha a K_d-t a talaj/oldat arányával megszorozva az eredmény > 0,3, és ha a koncentráció vizes fázisbeli csökkenésére alapulnak a mérések (közvetett módszer), vagy K_d > 0,1, ha mindkét fázist elemzik (közvetlen módszer) (61).

1.9.2.5. *3. szint – Adszorpciós izotermák és deszorpciós kinetika/deszorpciós izotermák*

1.9.2.5.1. Adszorpciós izotermák

Öt vizsgált anyagkoncentrációt alkalmaznak, amelyek lehetőleg két nagyságrendet fednek le; e koncentrációk kiválasztásában figyelembe kell venni a vízoldhatóságot és az előálló vizes egyensúlyi koncentrációkat. A vizsgálat során azonos talaj/oldat arányt kell fenntartani az egyes talajokra nézve. Az adszorpciós vizsgálatot a fent ismertettek szerint végzik el, azzal az egy különbséggel, hogy a vizes fázist csak egyszer, (a 2. szint vizsgálatai alapján) az egyensúly kialakulásához szükséges idő elteltével határozzák meg. Megmérik az oldat egyensúlyi koncentrációját, és az adszorbeált mennyiséget vagy a vizsgált anyagnak az oldatbeli kimerüléséből vagy a közvetlen módszerből számítják ki. A talaj által grammonként adszorbeált tömeget a vizsgált anyag egyensúlyi koncentrációjának függvényeként ábrázolják (lásd Adatok és jelentéskészítés).

Az adszorpciós izotermák meghatározására irányuló vizsgálatok eredményei:

Az eddig javasolt matematikai adszorpciós modellek közül a Freundlich-féle izoterma az egyik leggyakrabban használt, adszorpciós folyamatok leírására szolgáló modell. Az adszorpciós modellek értelmezésére és fontosságára vonatkozóan részletesebb információ a szakirodalomban található (41) (45) (80) (81) (82).

Megjegyzés: Meg kell említeni, hogy a különböző anyagok KF (Freundlich-féle adszorpciós koefficienst) értékeinek összehasonlítása csak akkor lehetséges, ha ezeket a KF-értékeket azonos mértékegységben fejezik ki (83).

1.9.2.5.2. Deszorpciós kinetika

E kísérlet célja annak vizsgálata, hogy valamely vegyszer reverzibilisen vagy irreverzibilisen adszorbeálódik-e valamely talajban. Ez az információ fontos, mivel a deszorpciós folyamat is fontos szerepet játszik a vegyszerek környezeti talajban tanúsított magatartásában. Ezen túlmenően a deszorpciós adatok hasznos bemenő adatokat jelentenek az átmosódás és a kioldódás szimulált számítógépes modellezéséhez. Ha deszorpciós vizsgálatot kívánnak végezni, ajánlatos az alábbiakban ismertetett vizsgálatot minden egyes rendszerre elvégezni, amelyre nézve a megelőző adszorpciós kinetikai kísérlet során pontosan meg lehetett határozni a K_d-értéket.

Hasonlóan az adszorpciós kinetikai vizsgálathoz, a deszorpciós kinetikai kísérletnél két lehetőség szerint lehet eljárni: a) a párhuzamos módszer; és b) a „folytatásos” módszer. A követendő módszertan kiválasztása a kísérletet végzőn múlik, akinek figyelembe kell vennie a rendelkezésre álló laboratóriumi felszereléseket és eszközöket.

▼B

a) párhuzamos módszer: mindegyik talajra nézve, amelyet a deszorpciós vizsgálat elvégzésére kiválasztanak, azonos talaj/oldat arányú mintákat készítenek, annyit, ahány időintervallumra vizsgálni kívánják a deszorpciós kinetikát. Lehetőség szerint ugyanazokat az időintervallumokat kell használni, mint az adszorpciós kinetikai kísérletnél; a teljes időtartamot azonban meg lehet hosszabbítani annak érdekében, hogy a rendszer elérje a deszorpciós egyensúlyt. Minden kísérletben (egy talaj, egy oldat) egy vakmintát is vizsgálnak. Ez a talajból és 0,01 M $CaCl_2$ oldatból áll, vizsgált anyagot nem tartalmaz, tömegét és térfogatát tekintve megegyezik a kísérletben alkalmazottakkal. Kontrollmintaként a vizsgált anyag 0,01 M $CaCl_2$ oldatban (talaj nélkül) oldott formáját azonos vizsgálati eljárásnak vetik alá. Az összes talaj os keveréket addig rázzák, amíg eléri az adszorpciós egyensúlyi helyzetet (a korábban a 2. szintnél meghatározott módon). Ezt követően a fázisokat centrifugálással szétválasztják, és a vizes fázisokat a lehető legnagyobb mértékben eltávolítják. Az eltávolított oldat térfogatát azonos térfogatú 0,01 M $CaCl_2$-oldattal helyettesítik vizsgált anyag nélkül, és az új keverékeket újra rázatják. Az első kémcső vizes fázisát a lehető legnagyobb mértékben eltávolítják, és elemzik, pl. 2 óra után, a második kémcsőét 4 óra után, a harmadik kémcsőét 6 óra után stb., amíg a deszorpciós egyensúlyt elérik.

b) „folytatásos” módszer: az adszorpciós kinetikai kísérletet követően a keveréket centrifugálják, és a vizes fázist a lehető legnagyobb mértékben eltávolítják. Az eltávolított oldat térfogatát azonos térfogatú 0,01 M $CaCl_2$-oldattal, vizsgált anyag nélkül pótolják. Az új keveréket addig rázzák, amíg eléri a deszorpciós egyensúlyi helyzetet. Ezen időszak alatt, meghatározott időközönként a keveréket centrifugálják, hogy a fázisokat szétválasszák. A vizes fázis egy kis aliquot részét azonnal elemzik a vizsgált anyagra nézve; majd a kísérlet az eredeti keverékkel folytatódik. Az egyes kivett aliquotok térfogata az oldat össztérfogatának 1 %-ánál kevesebb. A keverékhez azonos mennyiségű friss 0,01 M $CaCl_2$-oldatot adnak a talaj oldat arány fenntartásához, és a rázás a következő időintervallumig folytatódik.

A százalékos deszorpciót mindegyik (D_{t_i}) időpontban és/vagy ($D_{\Delta t_i}$) időintervallumban (a vizsgálat szükségleteinek megfelelően) kiszámítják, és az idő függvényében ábrázolják. Az egyensúlyi K_{des} deszorpciós koefficienst is kiszámítják. Az összes vonatkozó egyenlet szerepel az Adatok és jelentéskészítés szakaszban, valamint az 5. függelékben.

Deszorpciós kinetikai kísérletek eredményei:

A deszorpció D_{t_i} és a százalékos adszorpció A_{t_i} idő függvényében létrehozható közös ábrái lehetővé teszik az adszorpciós folyamat reverzibilitásának becslését. Ha a deszorpciós egyensúlyt még az adszorpciós egyensúly kialakulásához szükséges idő kétszeresén belül elérik, és az összdeszorpció az adszorbeált mennyiség 75 %-ánál több, az adszorpció reverzibilisnek minősül.

1.9.2.5.3. Deszorpciós izotermák

A Freundlich-féle deszorpciós izotermákat az adszorpciós izoterma kísérlethez használt talajokra határozzák meg. A deszorpciós vizsgálatot a Deszorpciós kinetika című szakaszban ismertetettek szerint folytatják le, azzal az egyetlen különbséggel, hogy a vizes fázist csak egyszer, a deszorpciós egyensúlyi helyzetben elemzik. Kiszámítják a deszorbeálódott vizsgált anyag mennyiségét. A deszorpciós egyensúlyi helyzetben a talajban adszorbeáltan maradó vizsgáltanyagtartalmat a vizsgált anyag oldatban lévő egyensúlyi koncentrációjának függvényében ábrázolják (lásd az Adatok és jelentés készítés című szakaszt és az 5. függeléket).

▼B

2. **ADATOK ÉS JELENTÉSKÉSZÍTÉS**

Az elemzésből kapott adatokat táblázat formájában mutatják be (lásd 6. függelék). Megadják az egyedi mérések eredményeit és a számított átlagokat. Az adszorpciós izotermák grafikus megjelenítését is csatolják. A számításokat az alábbiakban leírtak szerint végzik.

Feltételezik, hogy 1 cm^3 vizes oldat tömege 1 g. A talaj/oldat arányt tömeg/tömeg vagy tömeg/térfogatömeg/térfogat egységekben azonos mértékegységgel lehet kifejezni.

2.1. ADSZORPCIÓ

Az A_{t_i} adszorpciót a vizsgálati feltételek mellett a talajban adszorbeált anyagnak a vizsgálat kezdetekor jelen lévő mennyiségéhez viszonyított százalékos arányban határozzák meg. Ha a vizsgált anyag stabil, és jelentősen nem adszorbeálódik a tesztedény falán, az A_{t_i} értéket mindegyik ti időpontban a következő egyenlet szerint számítják ki:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}(\%) \qquad (3)$$

ahol:

A_{ti} = adszorpció mértéke a t_i időpontban (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = a vizsgált anyag talajban adszorbeált tömege t_i időpontban (μg);

m_0 = a vizsgált anyag tömege a kémcsőben a vizsgálat kezdetén (μg).

Az A_{t_i} százalékos adszorpció arányának a párhuzamos és a „folytatásos” módszer szerinti kiszámítására vonatkozó részletes információt az 5. függelék adja meg.

A K_d megoszlási koefficiens a talaj fázisban lévő anyagtartalom és a vizes oldatban található anyag tömegkoncentrációjának aránya azon vizsgálati feltételek mellett, amikor beáll az adszorpciós egyensúlyi helyzet.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (4)$$

ahol:

$C_s^{ads}(eq)$ = a talajban adszorbeált anyagtartalom adszorpciós egyensúlyi helyzetben ($\mu g.g^{-1}$)

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = az anyag tömegkoncentrációja a vizes fázisban adszorpciós egyensúlyi helyzetben ($\mu g.cm^{-3}$). Ezt a koncentrációt analitikusan, a vakpróbákból származó értékek figyelembevételével határozzák meg;

$m_s^{ads}(eq)$ = a vizsgált anyag talajban adszorbeálódott tömege adszorpciós egyensúlyi helyzetben (μg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = a vizsgált anyag tömege az oldatban adszorpciós egyensúlyi helyzetben (μg)

M_{talaj} = a talajfázis mennyisége, talaj szárazanyag-tartalomban kifejezve (g)

V_0 = a talajjal érintkező vizes fázis kiindulási térfogata (cm^3)

The relation between Aeq and Kd is given by

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

ahol:

A_{eq} = az adszorpció mértéke adszorpciós egyensúlyi helyzetben, %.

A szervesszén-tartalomra vonatkoztatott K_{oc} adszorpciós koefficiens a K_d megoszlási koefficienst a talajminta szervesszén-tartalmához viszonyítja:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

ahol:

%OC = a szerves szén aránya a talajmintában (g g^{-1}).

A K_{oc} koefficiens olyan érték, amely önmagában jellemzi a nagyobbrészt apoláros szerves vegyületeknek a talajok vagy üledékek szervesszén-tartalma és a víz közötti megoszlását. E vegyszerek adszorpcióját a szorbeáló szilárd anyag szervesanyag-tartalmával korrelálják (7); így a K_{oc} értékek a humuszfrakciók specifikus jellemzőitől függnek, amelyek jelentősen eltérnek szorpciós kapacitás tekintetében, az eredet, képződés stb. eltérései miatt.

2.1.1. **Adszorpciós izotermák**

A Freundlich-féle adszorpciós izoterma egyenlet az adszorbeált vizsgált anyag mennyiségét az egyensúlyi helyzetben lévő oldatban található vizsgáltanyag-koncentrációjához viszonyítja (8. egyenlet).

Az adatokat az „Adszorpció” című pont alatt ismertetett módon kezelik, és mindegyik kémcsőben kiszámítják az adszorpciós vizsgálat után a talajon adszorbeálódott vizsgált anyag tartalmat ($C_s^{ads}(eq)$), amelyet máshol x/m-ként jelölnek). Feltételezik, hogy az egyensúlyi helyzet beállt, és a $C_s^{ads}(eq)$) az egyensúlyi értéket mutatja:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{talaj}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)].V_0}{m_{talaj}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

A Freundlich-féle adszorpciós egyenlet a következő (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads}.C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

vagy lineáris formában:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

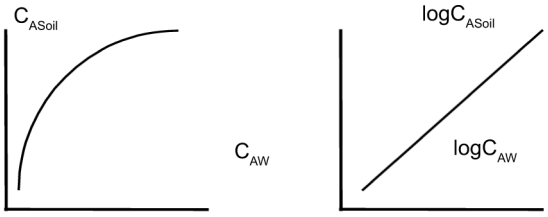
ahol:

K_F^{ads} = Freundlich-féle adszorpciós koefficiens: mértékegysége $cm^3\ g^{-1}$. ha 1/n = 1; minden más esetben az 1/n meredekséget a K_F^{ads} ($\mu g^{\ 1-1/n}\ (cm^3)^{1/n}.g^{-1}$ dimenziójában fejezik ki

n = regressziós konstans; az 1/n általában 0,7–1,0 között van, ami azt jelzi, hogy a szorpciós adatok gyakran nem teljesen lineárisak.

A (8) és (9) egyenletet ábrázolják és a K_F^{ads} és 1/n értékeket regressziós analízissel elemzik a 9. egyenlet alkalmazásával. A logaritmusos egyenlet r_2 korrelációs koefficiensét is kiszámítják. Az ilyen ábrázolás egy példáját mutatja be a 2. ábra.

▼B



2. ábra Freundlich-féle adszorpciós görbe, normál és linearizált

2.1.2. **Tömegegyensúly**

A tömegegyensúlyt (MB) az adszorpciós vizsgálatot követően analitikusan visszanyerhető anyag és az anyagnak a vizsgálat kezdetekor meglévő névleges mennyisége arányaként határozzák meg.

Az adatok kezelése attól függ, hogy az oldószer mennyiben elegyedik a vízzel. A vízzel elegyedő oldószerek esetén a „Deszorpció" cím alatt ismertetett módon lehet az adatokat kezelni az oldószer kivonása révén visszanyert anyagmennyiség meghatározásához. Ha az oldószer kevésbé elegyedik a vízzel, meg kell határozni a visszanyert tesztanyagmennyiséget.

Az adszorpciós tömegegyensúlyt (MB) a következőképpen számítják ki; feltételezik, hogy a (mE) kifejezés megfelel a talajból és a tesztedény faláról szerves oldószerrel extrahált tömegek összegének:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}(\%) \qquad (10)$$

ahol:

MB = tömegegyensúly (%)

m_E = a talajból és a tesztedény falairól két lépésben extrahált vizsgált anyag össztömege (μg)

C_0 = a talajjal érintkezésben lévő vizsgált oldat kiindulási tömegkoncentrációja (μg cm^{-3})

V_{rec} = az adszorpciós ekvilibriumban visszanyert felülúszó térfogata (cm^3.

2.2. DESZORPCIÓ

A (D) deszorpciót a vizsgálat feltételei mellett deszorbeált vizsgált anyagnak a korábban adszorbeált anyagmennyiségéhez viszonyítva határozzák meg:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

ahol:

D_{ti} = deszorpció mértéke t_i időpontban (%)

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = a vizsgált anyag talajból deszorbeált tömege t_i időpontban (μg)

$m_s^{ads}(eq)$ = a vizsgált anyag talajon adszorbeált tömege adszorpciós egyensúlyi helyzetben (μg).

A párhuzamos és „folytatásos” módszerek esetén a D_{t^i} deszorpció arányának kiszámítására vonatkozó részletes információ az 5. függelékben található.

A vizsgálati feltételek mellett a K_{des} látszólagos deszorpciós koefficiens a talajfázisban maradó anyagtartalom és a vizes oldatban deszorbeálódott anyag tömegkoncentrációjának aránya a deszorpciós egyensúly elérésekor:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)\ V_T}{m_{aq}^{des}(eq) \qquad m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \tag{12}$$

ahol:

K_{des} = deszorpciós koefficiens ($cm^3\ g^{-1}$)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = a vizsgált anyag talajból deszorbeálódott össztömege deszorpciós egyensúlyi helyzetben (μg)

V_T = a talajjal érintkező vizes fázis össztérfogata a deszorpciós kinetikai kísérlet során (cm^3).

Az $m_{aq}^{des}(eq)$ kiszámítására vonatkozó útmutatás az 5. függelékben a „Deszorpció” cím alatt található.

Megjegyzés:

Ha az előbbi adszorpciós vizsgálatot a párhuzamos módszerrel végezték, a 12. egyenletben a V_T térfogat egyenlő a V_0 térfogattal.

2.2.1. **Deszorpciós izotermák**

A Freundlich-féle deszorpciós izoterma egyenlet a talajban adszorbeáltan maradó vizsgáltanyag-tartalmat a deszorpciós egyensúlyi helyzetben az oldatban maradó vizsgált anyag koncentrációhoz viszonyítja (16. egyenlet).

Az egyes kémcsövekre nézve a deszorpciós egyensúlyi helyzetben talajban adszorbeáltan maradó anyagtartalmat a következőképpen számítják ki:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{talaj}} (\mu g\ g^{-1}) \tag{13}$$

definíciója:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A\ (\mu g) \tag{14}$$

ahol:

$C_s^{des}(eq)$ = a talajon adszorbeálva maradó vizsgált anyagtartalom deszorpciós egyensúlyi helyzetbe[11] ($\mu g\ g^{-1}$)

$m_m^{des}(eq)$ = a vizsgált anyag analitikus módon meghatározott tömege a vizes fázisban deszorpciós egyensúlyi helyzetben (μg)

▼B

m_{aq}^{A} = a vizsgált anyagnak az adszorpciós egyensúlyi helyzet elérését követően a tökéletlen folyadékeltávolítás miatt fennmaradt tömege (μg)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = az anyag tömege az oldatban adszorpciós egyensúlyi helyzetben (μg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = a kémcsőből a vizsgált anyag mérésére kivett oldat térfogata deszorpciós egyensúlyi helyzetben (cm^3)

V_R = az adszorpciós egyensúlyi helyzet elérését követően a kémcsőből eltávolított telülúszó és azonos tértogatú 0,01 M $CaCl_2$-oldattal pótolt térfogat (cm^3)

A Freundlich-féle deszorpciós egyenlet a következő:

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

vagy lineáris formában:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F{}^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}{}^{des}(eq) \quad (17)$$

ahol:

K_F^{des} = Freundlich-féle deszorpciós koefficiens

n = regressziós konstans

$C_{aq}^{des}(eq)$ = az anyag tömegkoncentrációja a vizes fázisban deszorpciós egyensúlyi helyzetben ($\mu g.cm^{-1}$).

A 16. és 17. egyenletet ábrázolni lehet, és a $K_F{}^{des}$ és 1/n értékét a 17. egyenlet alapján regressziós analízissel számítják ki.

Megjegyzés:

Ha a Freundlich-féle adszorpciós vagy deszorpciós exponens 1/n egyenlő 1-gyel, a Freundlich-féle adszorpciós vagy deszorpciós kötési állandó (K_F^{ads} és K_F^{des}) egyenlő az adszorpciós, illetve deszorpciós egyensúlyi állandóval (K_d és K_{des}), és a C_s ábrázolása a C_{aq} függvényében lineáris lesz. Ha az exponensek nem egyenlők 1-gyel, a C_s ábrázolása a C_{aq} függvényében nem lineáris és az adszorpciós és deszorpciós állandók az izotermák mentén változnak.

2.2.2. **Vizsgálati jelentés**

A vizsgálati jelentésben a következő információknak kell szerepelniük:

— a felhasznált talajminták részletes jellemzése, beleértve:

— a származási hely földrajzi azonosítása (szélességi, hosszúsági fok),

— mintavétel dátuma,

▼B

— használat jellege (pl. termőföld, erdő stb.),

— mintavételi mélység,

— homok-/vályog-/agyagtartalom,

— pH-értékek (0,01 M $CaCl_2$-ben),

— szervesszén-tartalom,

— szervesanyag-tartalom,

— nitrogéntartalom,

— C/N arány,

— kationcsere-kapacitás (mmol/kg),

— a talajminták gyűjtésével és tárolásával kapcsolatos minden információ,

— adott esetben a vizsgált anyag adszorpciójának/deszorpciójának értelmezésére vonatkozó összes releváns információ,

— az egyes paraméterek meghatározásához használt módszerek felsorolása,

— a vizsgált anyagra vonatkozó információ (szükség szerint),

— a vizsgálati hőmérsékletek,

— a centrifugálás körülményei,

— a vizsgált anyag elemzésénél alkalmazott analitikus eljárás,

— a vizsgált anyag törzsoldatának elkészítéséhez használt bármilyen, oldódást segítő anyag használatának indoklása,

— a számításokban végrehajtott korrekciók magyarázata, amennyiben releváns,

— az adatlapon feltüntetendő adatok (6. függelék) és a grafikonok,

— a vizsgálati eredmények értelmezéséhez segítséget nyújtó minden információ és megfigyelés.

3. **SZAKIRODALOM**

(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 (Koc) 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), FNRA, 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 Böden”. Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143-154.

(27) Hamaker J. W., (1975), „The interpretation of soil leaching experiments”, in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V. H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.

(28) Helling C. S., (1971), „Pesticide mobility in soils”. Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 35, pp. 732-210.

(29) Hamaker J. W., (1972), „Diffusion and volatilization” in Organic chemicals in the soil environment (C. A. I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I, pp. 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system”. Pestic. Sci. 12, pp. 37-44.

(31) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G, (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses”, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D. I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide 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 – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

(52) Black, Evans D. D., White J. L., Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. „Methods of Soil Analysis”, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), „Precision in pesticide adsorption measurements". Soil Sci. Am. Proc, 34, pp. 353-354.

(60) Grover R., and Hance R. J. (1970), „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine". Soil Sci., pp. 109-138.

(61) Boesten, J. J. T. I, „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system". Pest. Sci. 1990, 30, pp. 31-41.

(62) Boesten, J. J. T. I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106". Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J. M., et Coste C, (1980), „Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique". Weed Res. 21, pp. 227-231.

(64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments". J. Environ. Qual., 10(3), pp. 382-386.

(65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), „Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water". Environ. Sci. Technol., 17(4), pp. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments". J. Environm. Sci. Health, B19 (3), pp. 297-312.

(67) Vowles P. D., and Mantoura R. F. C, (1987), „Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons". Chemosphere, 16(1), pp. 109-116.

(68) Lyman W. J., Reehl W. F. and Rosenblatt D. H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I. (1980). „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota" in Aquatic Toxicology (eds J. G Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds”. Science, Vol. 206, pp. 831-832.

(71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G., and Means J. C, (1981), „Sorption of /-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption”. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, pp. 38-42.

(72) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”. Chemosphere, Vol. 10(8), pp. 833-846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), „Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité”. Revue de l'Agric., 34 (4), pp. 319-322.

(74) Müller M., Kördel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil”. Chemosphere, 32(12), pp. 2493- 2504.

(75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – results of a ring test”. Chemosphere 30 (7), pp. 1373-1384.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases”. Chemosphere 27 (12), pp. 2341-2352.

(77) Hance, R. J., (1967), „The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides”. Weed Research, Vol. 7, pp. 29-36.

(78) Koskinen W. C, and Harper S. S., (1990), „The retention processes: mechanisms” in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H. H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses”, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C. H., (1970), „Interpretation and use of sorption isotherms” in Sorption and Transport Processes in Soils. S. C. I. Monograph No. 37, pp. 14-32.

(81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S. N. and Smith, D, (1960), „Studies in adsorption: 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, pp.3973-93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J. C, (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption”. Ann. Agron. 31: pp. 239-251.

(83) Bedbur E., (1996), „Anomalies in the Freundlich equation”, Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

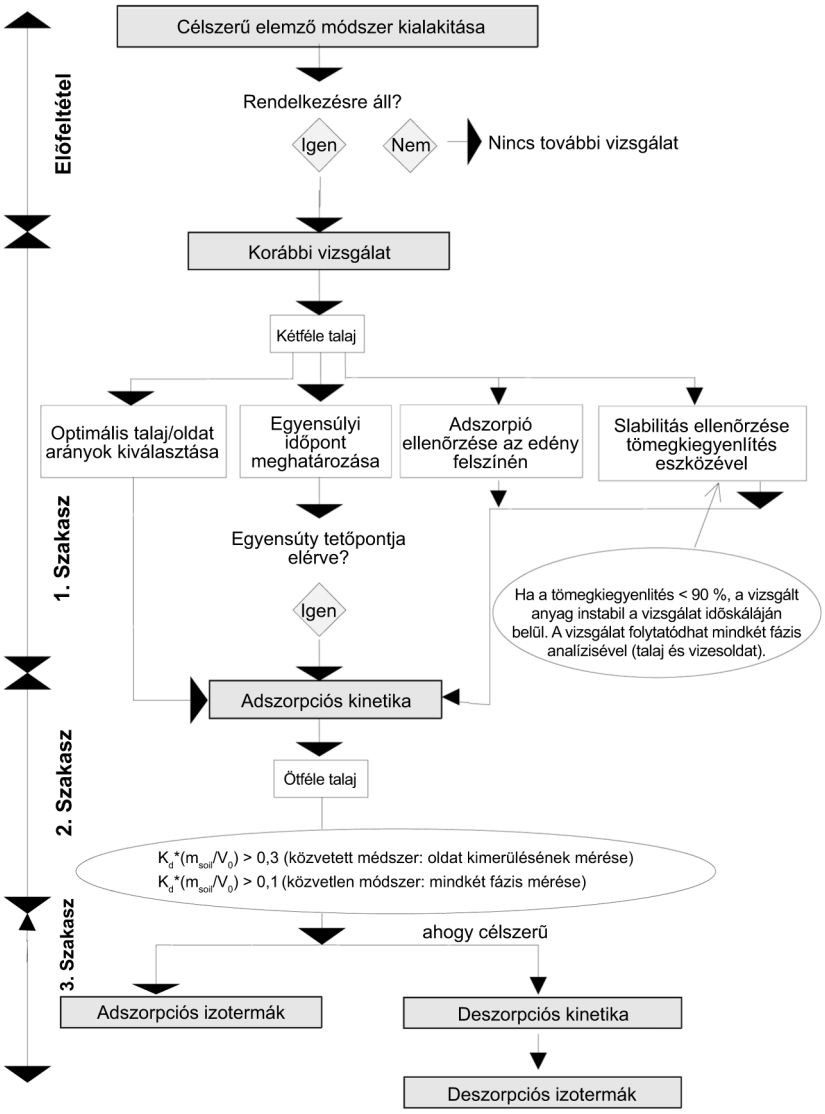
(84) Guth, J. A., (1985), „Adsorption/desorption”, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

1. függelék

A vizsgálat terve



▼B

2. függelék

AZ ELEMZÉSI MÓDSZER PONTOSSÁGÁNAK ÉS A KONCENTRÁCIÓ VÁLTOZÁSÁNAK HATÁSA AZ ADSZORPCIÓS EREDMÉNYEK PONTOSSÁGÁRA

Az alábbi táblázatból (84) egyértelműen kiderül, hogy amikor nagyon csekély a különbség az oldatban lévő vizsgált anyag kiindulási tömege (m_0 = 110 µg) között, akkor az egyensúlyi koncentráció eredményének mérésekor bekövetkező 5 % mérési hiba a talaj által adszorbeált anyag tömegének ($m_{aq}^{ads}(eq)$) kiszámításakor 50 %-os hibát, a K_d kiszámításakor 52,4 %-os hibát eredményez.

Talaj mennyisége m_{talajl} = 10 g

Oldat térfogata 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‡
	FOR A = 9 %							
m_0 = 110 µg vagy C_0=1,100 µg/cm^3	100	1,000	valós érték	10	1,00	valós érték	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 %
	FOR A = 55 %							
m_0= 110 µg vagy C_0=1,100 µg/cm^3	50,0	0,500	valós érték	60,0	6,00	valós érték	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 %
	FOR A = 99 %							
m_0 = 110 µg vagy C_0=1,100 µg/cm^3	1,100	0,011	valós érték	108,9	10,89	valós érték	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right]V_0}{m_{talaj}}. \; Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{talaj}}$$

$m_s^{ads}(eq)$ = a vizgált anyag tömege a szilárd fázisban, egyensúly esetén µg

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = a vizgált anyag tömege egyensúlyi vizes fázisban, µg

$C_s^{ads}(eq)$ = a szilárd fázis tesztanyagtartalma egyensúlyban, µg, g^{-1}

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = a vizsgált anyag tömegkoncentrációja egyensúlyi vizes fázisban, µg cm^{-3}

R = a $m_{aq}^{ads}(eq)$ meghatározásakor elkövetett analitikai hiba

R‡ = az analitikai hiba (R) miatt bekövetkező számítási hiba

▼B

3. függelék

ELJÁRÁSOK A K_d ÉRTÉKÉNEK BECSLÉSÉRE

1. Ezek a módszerek lehetővé teszik a K_d értékének a becslését, vizsgálva a következő tényezők valamelyikével mutatott korrelációt: pl. P_{ow} értékek (12) (39) (63–68), vízoldhatósági adatok (12) (19) (21) (39) (68–73), vagy polaritási adatok, amelyek reverz fázisú HPLC-s vizsgálatokkal nyerhetők (74–76). Az 1. és 2. táblázatban látható egyenletek alapján kiszámítják a K_{oc} és a K_{om} értékeit, ezután pedig indirekt módon a K_d-t az alábbi egyenletek alapján:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc}\,(cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%oc}\,(cm^3 g^{-1})$$

2. E korrelációk alapgondolata két kiinduló feltételezésen alapul: (1) egy adott anyag adszorpcióját főként a talaj szervesanyag-tartalma befolyásolja; és (2) a lezajló kölcsönhatások túlnyomórészt nem poláros jellegűek. Ennek eredményeként, ezek az összefüggések: (1) nem vagy csak bizonyos mértékig alkalmazhatók a poláros anyagokra; és (2) nem alkalmazhatók olyan esetekben, amikor nagyon csekély a talaj szervesanyag-tartalma (12). Ezenfelül bár kielégítő bizonyossággal megállapítható a korreláció a P_{ow} értéke és az adszorpció mértéke között (1), nem mondható el ugyanez a vízoldhatóság és az adszorpció mértéke közötti összefüggésről (19) (21), ahol az eddigi vizsgálatok erősen ellentmondásos eredményekre vezettek.

3. Az adszorpciós koefficiens és az oktanol/víz megoszlási koefficiens közötti korrelációra, valamint a vízoldhatóságra vonatkozó néhány példa szerepel az 1., illetve 2. táblázatban.

1. táblázat:

Példák az adszorpciós megoszlási koefficiens és az oktanol/víz megoszlási koefficiens közötti korrelációra: további példákért lásd (12) (68)

Anyagok	Korreláció	Szerzők
Szubsztituált ureák	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Animás klórozott vegyületek	$\log K_{oc} = - 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou *a al*. (1983) (65)
Különféle peszticidek	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gersel és Mingelgrin (1984) (66)
Aromás szénhidrogének	$\log K_{oc} = - 2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles és Mantoura (1987) (67)

2. táblázat:

Példák az adszorpciós megoszlási koefficiens és a vízoldhatóság közötti korrelációra; további példákért lásd (68) (69)

Anyagok	Korreláció	Szerzők
Különféle peszticidek	$\log K_{om} = 3{,}8 – 0{,}561 \log S_w$	Gerstl és Mingelgrin (1984) (66)
Alifás, aromás klórozott vegyületek	$\log K_{om} = (4{,}040 +/- 0{,}038) - (0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_w$	Chiou *et al*. (1979) (70)
Alfa-naftol	$\log K_{oc} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Ciklikus, alifás aromás vegyületek	$\log K_{oc} = - 1{,}405 - 0{,}921 \log S_w - 0{,}0095{,}3$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Különféle vegyületek	$\log K_{om} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

4. függelék

SZÁMÍTÁSOK A CENTRIFUGÁLÁS KÖRÜLMÉNYEINEK MEGHATÁROZÁSÁHOZ

1. A centrifugálás idejét az alábbi képlettel lehet kiszámítani, gömb formájú részecskéket feltételezve:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 r p^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln (R_b/R_t) \qquad (1)$$

Az egyszerűsítés érdekében a paraméterek itt nem SI mértékegységben vannak megadva (g, cm).

ahol:

ω = forgási sebesség (= 2 p pm/60) rad s^{-1}

rpm = fordulatszám/perc

η = oldat viszkozitása, g s^{-1} cm^{-1}

r_p = részecske sugara, cm

ρ_s = talaj sűrűsége, g cm^3

ρ_{aq} = oldat sűrűsége, g cm^3

R_t = a centrifuga rotorjának középpontja és a centrifugacsőben lévő oldat teteje közötti távolság, cm

R_b = a centrifuga rotorjának középpontja és a centrifugacső alja közötti távolság, cm

$R_b - R_t$ = a centrifugacsőben lévő talaj/oldat keverék hossza, cm

A bevett gyakorlat szerint a számított időértékek kétszerese biztosítja a tökéletes szétválasztást.

2. Az (1) egyenlet tovább egyszerűsíthető, ha az oldat viszkozitását (η) és sűrűségét (ρ_{aq}) azonosnak tekintjük a 25 °C hőmérsékletű víz viszkozitásával és sűrűségével; tehát $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g $s^{-1}cm^{-1}$ és $\rho_{aq} = 1{,}0$ g.cm^{-3}.

Ebből adódóan a centrifugálási idő hosszát a (2) egyenlet adja meg:

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 . r_p^2(\rho_s - 1)} \ln \frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. A (2) egyenlet alapján nyilvánvaló, hogy a centrifugálás körülményeinek, azaz az idő (t) és a sebesség (rpm) meghatározása során alapvetően két paraméter fontos, annak érdekében, hogy el lehessen különíteni meghatározott méretű récsecskéket (a mi esetünkben a 0,1 mm sugarúakat); (1) a talaj sűrűsége és (2) a centrifugacsőben lévő elegy hossza (R_t-R_b), azaz azon távolság, amelyet az oldat felszíni tetőpontja és a cső alja között egy talajrészecske megtesz; nyilvánvaló, hogy egy rögzített térfogat esetében a csőben lévő elegy hossza a cső sugara négyzetének függvénye.

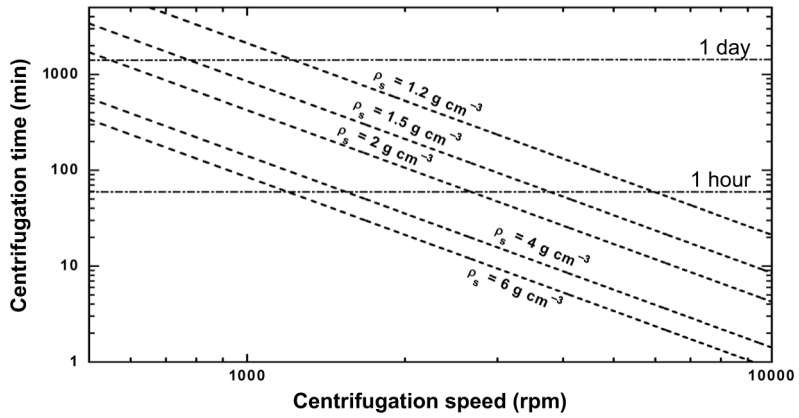
4. Az 1. ábra bemutatja a centrifugálás időtartamát (t) különböző talaj sűrűségek esetében, a centrifugálás sebességének függvényében, az 1b. ábra pedig ugyanezt a keverék hosszának a centrifugacsőben függvényeként ábrázolja. Az 1a. ábrából egyértelműen látható a talaj sűrűsűge által gyakorolt hatás; például egy átlagosnak mondható 3000 ford/perc fordulatszám mellett a centrifugálási idő megközelítőleg 240 perc, 1,2 g cm^{-3} talajsűrűség esetén, míg mindössze 50 perc a 2,0 cm^{-3} sűrűségű talaj esetén. Hasonlóképpen, az 1b. ábra alapján, egy átlagosnak mondható 3000 ford/perc fordulatszám mellett a centrifugálási idő mintegy 50 perc egy 10 cm hosszú elegy esetén, míg mindössze 7 perc egy 1 cm hosszú elegy esetén. Fontos azonban megtalálni a centrifugálási paraméterek közötti optimális egyensúlyt, ahol a lehető legkisebb mintahosszra van szükség, és ami lehetővé teszi a kísérletező számára a fázisok centrifugálást követő elkülönítését.

▼B

5. Továbbá a talaj/oldat fázisok elválasztása kísérleti feltételeinek meghatározásakor fontos figyelembe venni egy harmadik „pszeudofázis”-t, a kolloidok lehetséges jelenlétét. Ezek a 0,2 mm-nél kisebb méretű anyagrészecskék jelentős hatást gyakorolhatnak az anyag egész adszorpciós mechanizmusára a talaj szuszpenzióban. Ha a centrifugálást a fent leírtak szerint hajtják végre, akkor a kolloidok a vizes fázisban maradnak, és azzal együtt kerülnek elemzésre. Az általuk gyakorolt hatásra vonatkozó információk ezért elvesznek.

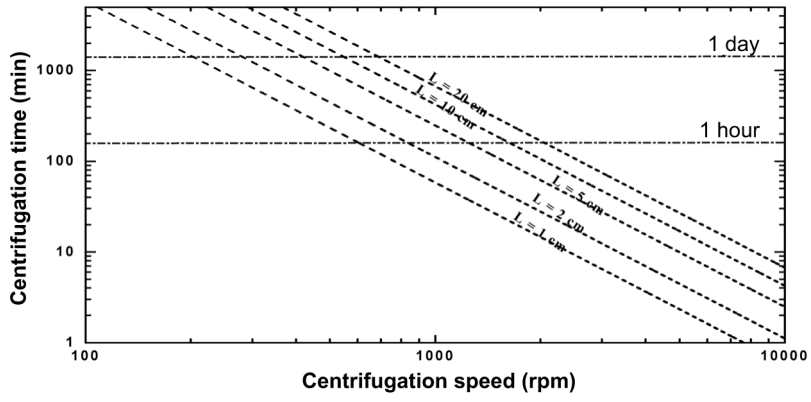
   Ha a kísérletet végző laboratórium rendelkezik ultracentrifugával vagy ultraszűrő berendezésekkel, akkor elmélyültebben lehet tanulmányozni az anyag talajban való adszorpcióját, illetve deszorpcióját, beleértve az anyagnak a kolloidrészecskék felületén bekövetkező adszorpcióját. Ebben az esetben 60 000 rpm fordulatszámú ultracentrifugálást vagy 100 000 Dalton porozitású ultraszűrőt kell használni a három fázis, azaz a talaj, a kolloidok és az oldat szétválasztására. A vizsgálat menetét ezért ennek megfelelően úgy kell módosítani, hogy mindhárom fázist alá lehessen vetni az anyagokra vonatkozó elemzésnek.

1a. ábra:



A centrifugálási idő (t) változása a centrifugálás sebességének (rpm) függvényében, különböző talajsűrűségek (p_s) mellett. R_t = 10 cm, R_b – R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g.s^{-1} cm^{-1} és ρ_{aq} = 1,0 g.1 cm^{-3} 25 °C-on

1b. ábra:



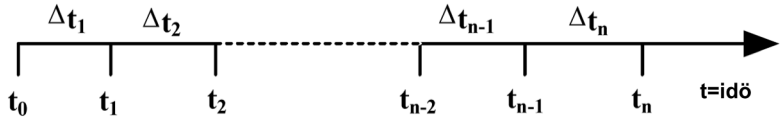
A centrifugálási idő (t) változása a centrifugálás sebességének (rpm) függvényében, a centrifugacsőbe helyezett keverék különböző hosszúsága esetén, (R_b – R_t) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10-^{3} g.s-^{1} cm-^{1}, ρ_{aq} = 1,0 g.cm-^{3} 25 °C-on és ρ_s = 2,0 g.cm-^{3} mellett.

▼B

5. függelék

AZ ADSZORPCIÓ (A, %) ÉS A DESZORPCIÓ (D, %) KISZÁMÍTÁSA

Az eljárás időskálája a következő:



Valamennyi számítás esetében feltételezzük, hogy a vizsgált anyag stabil, és nem adszorbeálódik jelentős mértékben az edény falán.

ADSZORPCIÓ (A %)

a) *Párhuzamos módszer*

Minden egyes kémcsőre (i) és minden egyes időpontra (t_i) nézve az alábbi képlet alapján kell a százalékos adszorpciót kiszámítani:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Az egyenlet elemei az alábbi módon számíthatók ki:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

ahol:

A_{ti} = százalékos adszorpció (%) t_i időpontban

$m_s^{ads}(t_i)$ = a vizsgált anyag talajon mért tömege a t_i időpontban, amikor a vizsgálatot végrehajtják (mg)

m_0 = a vizsgált anyag tömege a kémcsőben, a vizsgálat kezdetén (mg)

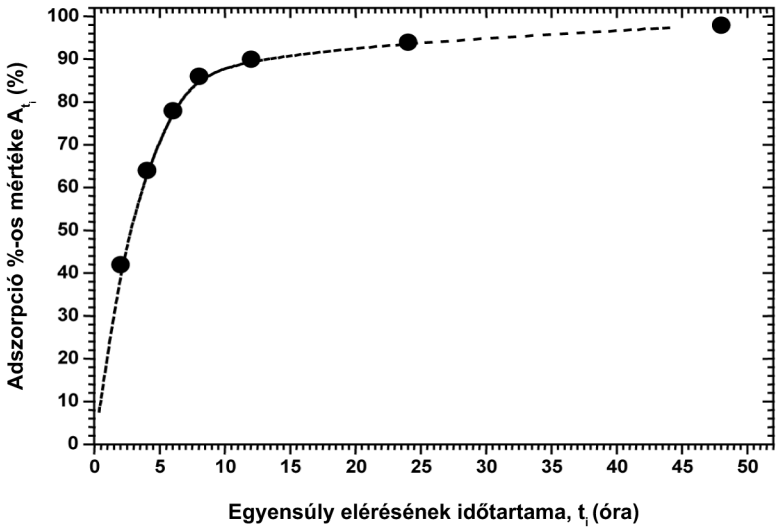
C_0 = a talajjal érintkező vizsgák oldat kiindulási tömegkoncentrációja (mg cm^{-3})

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = az anyag tömegkoncentrációja vizes fázisban abban a t_i időpontban, amikor az elemzést végzik (mg cm^{-3}); e koncentráció meghatározása analitikai úton történik, figyelembe véve a vak próbákkal kapott értékeket

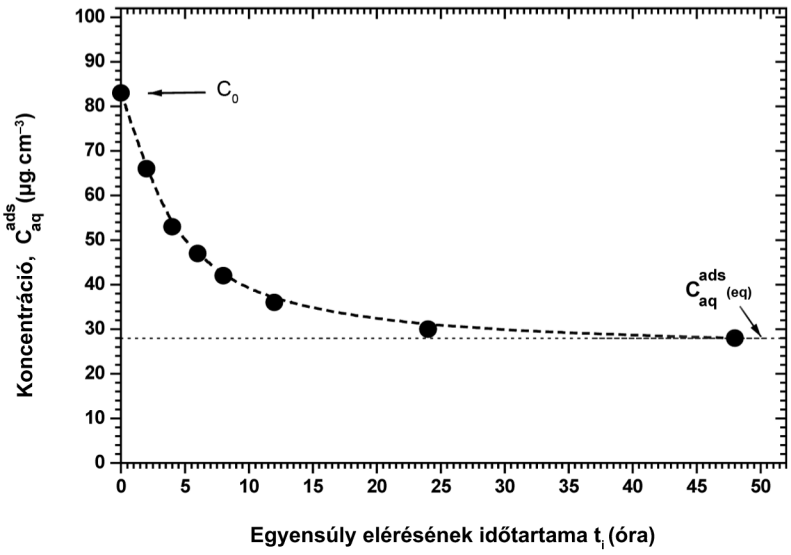
V_0 = a talajjal érintkező vizsgálati oldat kimdulási térfogata (cm^3)

A százalékos adszorpció értékeit A_{t_i} ill. $C_{aq}^{ads}(t_i)$ az idő függvényében grafikusan kell ábrázolni, valamint meg kell határozni azt az időt, amelyre a szorpciós ekvilibrium eléréséhez szükség volt. Az ilyen grafikus ábrázolás példáját az 1., illetve 2. ábra mutatja be.



1. ábra

Adszorpciós egyensúly grafikus ábrázolása



2. ábra

A vizsgált anyag tömegkoncentrációja vizes fázisban (C_{aq}) az idő függvényében

▼B

b) *„Folytatásos” módszer*

Az alábbi egyenletek figyelembe veszik, hogy az adszorpciós eljárás végrehajtása során a vizes fázis kis aliquotáiban a vizsgált anyagot meghatározott időtartamonként mérik.

— Minden egyes időtartam során a vizsgált anyag talajon adszorbeálódott mennyiségét az alábbi módon lehet kiszámítani:

— az első $\Delta_{ti} = t_i - t_0$ időintervallumra nézve:

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— a második időintervallumra nézve:

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— a harmadik $\Delta t_3 = t_3 - t_2$ időintervallumra nézve:

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— az n-edik $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$ időintervallumra nézve:

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— Az egyes időintervallumokra vonatkozó százalékos adszorpció $A_{\Delta t_i}$ az alábbi egyenlet segítségével számítható ki:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

(A_{t_i}) időpontra vonatkozó százalékos adszorpciót az alábbi egyenlet adja:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Az adszorpció A_{t_i} ill. $A_{\Delta t_i}$ értékeit (a vizsgálat igényei szerint) az idő függvényében grafikusan kell ábrázolni, valamint meg kell határozni azt az időt, amelyre a szorpciós egyensúly eléréséhez szükség volt.

— A t_{eq} ekvilibrációs idő elteltével:

— a vizsgált anyag talajon adszorbeálódott tömege:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— a vizsgált anyag oldatban lévő tömege

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— és a százalékos adszorpció egyensúlyi állapotban:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

A fent használt paraméterek jelentése az alábbi:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = a talajon adszorbeált tesztanyag tömege a Dt_1, Dt_2… illetve Dt_n időintervallumban (mg)

$m_m^{ads}(t_1)$, $m_m^{ads}(t_2)$, ..., $m_n^{ads}(t_n)$ = a ($v_a{}^A$) aliquotokban, a t_1, t_2,..., t_n időpontban mért tesztanyag tömege (μg)

$m_s^{ads}(eq)$ = az anyag talajon adszorbeálódott tömege adszorpciós egyensúlyi helyzetben (mg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = az anyag tömege az oldatban adszorpciós egyensúlyi helyzetben (mg)

$v_a{}^A$ = a vizsgált anyag mérésére használt aliquot térfogata (cm^3)

$A_{\Delta ti}$ = a százalékos adszorpció mértéke adott Dt_i időintervallumban (%)

A_{eq} = a százalékos adszorpció adszorpciós egyensúlyi helyzetben (%).

DESZORPCIÓ D (%)

Azt a t_0 időpontot tekintik a deszorpciós kinetikai kísérlet kezdetének, amikor a vizsgált anyagot tartalmazó oldat maximálisan (az adszorpciós egyensúly elérését követően) kinyert térfogatát ugyanolyan térfogatú 0,01 M $CaCl_2$-oldattal pótolják.

a) *Párhuzamos módszer*

A t_i időpontban megmérik az i (V_r^i) próbacsőből vett vizes fázisban lévő vizsgált anyag tömegét, és a deszorbeálódott tömeget az alábbi egyenlet segítségével számítják ki:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

A deszorpciós ekvilibriumban $t_i = t_{eq}$ és ezért $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

A (Δ_{ti}) időszak során deszorbeálódott vizsgált anyag tömege az alábbi egyenlettel számítható ki:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

A százalékos deszorpció kiszámítható:

a t_i időpontra nézve az alábbi egyenlettel:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{15}$$

és a (Δ_{ti}) időintervallumra nézve az alábbi egyenlettel:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{16}$$

ahol a fent használt paraméterek jelentése az alábbi:

D_{ti} = százalékos deszorpció a t_i időpontban (%)

$D_{\Delta ti}$ = a Δt_i intervallumnak megfelelő százalékos deszorpció (%)

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = a vizsgált anyag deszorbeálodott tömege a t_i időpontban (μg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = a vizsgált anyag deszorbeálodott tömege a D_{ti} időintervallumban (μg)

$m_m^{des}(t_i)$ = a vizsgált anyag t_i időpontban analitikus módon mért tömege a $V_r^{\ i}$ térfogatú oldatban, amelyet az elemzés céljára vettek ki (μg)

$m_{aq}^{\ A}$ = a vizsgák anyagnak az adszorpciós ekvilibrium elérését követően a tökéletlen folyadékeltávolítás miatt a talajban maradt tömege (μg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \tag{17}$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = az anyag tömege az oldatban adszorpciós egyensúlyi helyzetben (μg)

V_R = az adszorpciós egyensúlyi helyzet elérését követően a kémcsőből eltávolított, és azonos térfogatú 0,01 M $CaCl_2$ oldattal pótolt felülúszó-térfogat, (cm^3)

$V_r^{\ i}$ = Az (i) kémcsőből a vizsgált anyag mérésére kiemelt oldat térfogata a deszorpciós kinetikai kísérletben (cm^3)

A D_{ti}, illetve a $D_{\Delta t_i}$ deszorpciós értékeket (a vizsgálat igényei szerint) az idő függvényében grafikusan kell ábrázolni, valamint meg kell határozni azt az időt, amelyre a deszorpciós egyensúly eléréséhez szükség volt.

b) *„Folytatásos” módszer*

Az alábbi egyenletek figyelembe veszik azt, hogy a deszorpciós vizsgálatot megelőző adszorpciós vizsgálatot a vizes fázis kis aliquotáiban ((v_a^A)) lévő vizsgált anyag mennyiségének mérésével hajtották végre (lásd az „1.9. A vizsgálat végrehajtása” pontban ismertetett soros módszert). Feltételezzük, hogy: a) a felülúszó azon mennyiségét, amelyet a kémcsőből az adszorpciós kinetikai kísérletet követően eltávolítanak, azonos térfogatú 0,01 M $CaCl_2$-oldattal (V_g) pótolják; és b) a vizes fázisnak az adszorpciós kinetikai kísérlet során a talajjal érintkező össztérfogata (V_T) a deszorpciós vizsgálat során konstans marad és kiszámítható az alábbi egyenlettel:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \tag{18}$$

▼B

Egy t_i időpontban:

— A vizsgált anyag mennyiségét egy kivett kis térfogatban ((v_a^D)) meghatározzuk, és a deszorbeálódott tömeg az alábbi egyenlet segítségével kiszámítható:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— A deszorpciós ekvilibriumban $t_i = t_{eq}$ és ezért $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

— A százalékos deszorpció D_{t_i} a következő egyenlet segítségével számítható ki:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

Egy adott (Δt_i) időintervallumban:

Minden egyes időintervallumra nézve a deszorbeálódott anyag mennyisége az alábbiak szerint számítható ki:

— az első $\Delta t_1 = t_1 - t_0$ időintervallumra nézve:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— a második $\Delta t_2 = t_2 - t_1$ időintervallumra nézve:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right)$$

and (22)

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right]$$

— az n-dik $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$ intervallumra nézve:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

and (23)

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$$

Végül, az egyes időintervallumokra vonatkozó százalékos deszorpció $D_{\Delta t_i}$ az alábbi egyenlettel számítható ki:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (24)$$

a t_i időpontra vonatkozó D_{t_i} százalékos deszorpció az alábbi egyenlettel számítható ki:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (25)$$

▼B

ahol a fent használt paraméterek jelentése az alábbi:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = a talajon adszorbeálva maradó vizsgált anyag tömege a Δt_1, Δt_2…, illetve Δt_n időintervallum után (μg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = a Δt_1, Δt_2..., illetve Δt_n időintervallum során deszorbeálódott vizsgák anyag tömege (μg)

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = a ($v^D{}_a$) aliquotokban, a t_1, t_2, … illetve t_n időpontban mért tesztanyag tömege (μg)

V_T = a talajjal érintkezésben lévő vizes fázis össztérfogata a„folytatásos” mód- szerrel végrehajtott deszorpciós kinetikai kíséri a során (cm^3)

$m^A{}_{aq}$ = a vizsgált anyagnak az adszorpciós egyensúlyi helyzet elérését követően a tökéletlen folyadékeltávolítás miatt visszamaradó tömege (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 = az adszorpciós egyensúlyi helyzet elérését követően a kémcsőből eltávo- lított felülúszó és azonos térfogatú 0,01 M $CaCl_2$-oldattal pótok térfogat (cm^3)

v_a^D = az (i) kémcsőből a vizsgált anyag mérésére kiemelt aliquot térfogata a „folytatásos” módszerrel végzett deszorpciós kinetikai kísérletben (cm^3)

$$v_a^D \leq 0{,}02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

6. függelék

TALAJON TÖRTÉNŐ ADSZORPCIÓ/DESZORPCIÓ VIZSGÁLATA: ADATKÖZLŐ LAPOK

A vizsgált anyag megnevezése:

A vizsgált talaj:

A talaj szárazanyag-tartalma (105 °C, 12 óra): ..... %

Hőmérséklet: .....°C

Bemért talajmennyiség	g	
Talaj száraz tömege	g	
$CaCl_2$-oldat térfogata	cm^3	
Az oldat névleges végkoncentrációja	$\mu g\ cm^{-3}$	
Az oldat analitikai módszerrel meghatározott végkoncentrációja	$\mu g\ cm^{-3}$	

Az alkalmazott analitikai módszer alapelve:

Az analitikai modell kalibrálása:

A vizsgált anyag megnevezése:

A vizsgált talaj:

A talaj szárazanyag-tartalma (105 °C, 12 óra): ..... %

Hőmérséklet: .....°C

Az alkalmazott analitikai módszertan: Közvetett ☐ Párhuzamos ☐ Közvetlen ☐

Serial ☐

Adszorpciós vizsgálat: vizsgált minták

	Jele	Mérték-egysége	Ekvilibrációs idő		Ekvilibrációs idő		Ekvilibrációs idő		Ekvilibrációs idő	
Kémcsövek száma										
Bemért talajmennyiség	—	S								
Talaj száraz tömege	m_{talaj}	g								
A bemért talajban jelen levő víz (kiszámított) térfogata	V_{ws}	cm^3								
A talaj ekvilibrálásához felhasznált 0,01 M $CaCl_2$-oldal térfogata		cm^3								
Törzsoldat térfogata		cm^3								
A talajjal érintkezésben lévő vizes fázis össztérfogata	v_0	cm^3								
A vizsgált oldat kiindulási koncentrációja	C_0	$\mu g.cm^{-3}$								
A vizsgált anyag tömege a vizsgálat kezdetén	m_0	µg								

▼B

	Jele	Mérték-egysége	Ekvilibrá-ciós idő		Ekvilibrá-ciós idő		Ekvilibrá-ciós idő		Ekvilibrá-ciós idő	
Rázatás és centrifugálás után										
KÖZVETETT MÓDSZER										
Párhuzamos módszer										
A vizsgált anyagnak a vakpróba értékeivel korrigált koncentrációja a vizes fázisban	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	$\mu g.cm^{-3}$								
Folytatásos módszer										
A vizsgált anyag VAa aliquotban mért tömege	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
KÖZVETLEN MÓDSZER										
A vizsgált anyag talajon adszorbeálódott tömege	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Adszorpció kiszámítása										
Adszorpció	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Átlagok										
Adszorpciós koefficiens	K_d	$cm^3.g^{-1}$								
Átlagok										
A szerves széntartalomra számított adszorpciós koefficiens	K_{oc}	$cm^3.g^{-1}$								
Átlagok										

A vizsgált anyag megnevezése:

A vizsgált talaj:

A talaj szárazanyag-tartalma (105 °C, 12 óra): .....%

Hőmérséklet: .....°C

Adszorpciós vizsgálat: vakpróbák és kontroll

	Jele	Mérték-egysége	Vakpróba		Vakpróba		Kontroll	
Kémcsövek száma								
Bemért talajmennyiség		S					0	0
Víz mennyisége a bemért talajban (számított)		cm^3					—	—
A hozzáadott 0,01 M $CaCl_2$-oldat térfogata		cm^3						
A vizsgált anyag hozzáadott törzsoldatának térfogata		cm^3	0	0				
A vizes fázis össztérfogata (számított)		cm^3					—	—

▼B

	Jele	Mérték-egysége	Vakpróba		Vakpróba		Kontroll	
A vizsgált anyag kiindulási koncentrációja vizes fázisban		$\mu g.cm^{-3}$						

Rázatás és centrifugálás után

Koncentráció a vizes fázisban		$\mu g.cm^{-3}$						

Megjegyzés: szükség szerint a táblázat további oszlopokkal bővíthető.

A vizsgált anyag megnevezése:

A vizsgált talaj:

A talaj szárazanyag-tartalma (105 °C, 12 óra): ..... %

Hőmérséklet: .....°C

Tömegegyensúly

	Jele	Mérték-egyscége				
Kémcsövek száma						
Bemért talajmennyiség	—	g				
Talaj száraz tömege	m_{talaj}	g				
Viz mennyisége a bemért talajban (számított)	V_{ws}	ml				
A talaj ekvilibrálásához felhasznált 0,01 M $CaCl_2$-oldat térfogata		ml				
Törzsoldat térfogata		cm^3				
A talajjal érintkezésben lévő vizes fázis össztérfogata	V_0	cm^3				
A vizsgált oldat kiindulási koncentrációja	C_0	$\mu g.cm^{-3}$				
Ekvilibrációs idő	—	h				
Rázatás és centrifugálás után						
A tesztanyagnak a vakpróba értékeivel korrigált koncentrációja adszorpciós egyensúlyban	$C_{aq}^{ads}(eq)$	$\mu g.cm^{-3}$				
Ekvilibrációs idő	t_{eq}	h				
Első hígítás oldószerrel						
Vizes fázis eltávolított térfogata	V_{rec}	cm^3				
Oldószer hozzáadott térfogata	Δv	cm^3				
Első extrakció oldószerrel						
Oldószerben analizált jel	S_{E1}	var.				
A vizsgált anyag koncentrációja az oldószerben	C_{E1}	$\mu g.cm^{-3}$				

▼B

	Jele	Mérték-egyscége				
A talajból és az edény falairól extrahált anyag tömege	m_{El}	$\mu g.cm^{-3}$				
Második hígítás oldószerrel						
Az oldószer eltávolított mennyisége	ΔV_s	cm^3				
Az oldószer hozzáadott mennyisége	$\Delta v'$	cm^3				
Második extrakció oldószerrel						
Oldószerben analizált jel	S_{E2}	van				
A vizsgált anyag koncentrációja az oldószerben	C_{E2}	$\mu g.cm^{-3}$				
A talajból és az edény falairól extrahált anyag tömege	M_{E2}	µg				
A vizsgált anyag két lépésben extrahált össztömege	m_E	µg				
Tömegegyensúly	MB	%				

A vizsgált anyag megnevezése:

A vizsgált talaj:

A talaj szárazanyag-tartalma (105 °C, 12 óra): ..... %

Hőmérséklet: ..... °C

Adszorpciós izotermák

	Jele	Mérték-egysége								
Kémcsövek száma										
Bemért talajmennyiség	—	g								
Talaj száraz tömege	E	g								
Víz térfogata a bemért talajban (számított)	V_{WS}	cm^3								
A talaj ekvilibrálásához felhasznált 0,01 M$CaCl_2$-oldat terfbgata		cm^3								
A hozzáadott törzsoldat térfogata		cm^3								
A talajjal érintkezésben lévő vizes fázis össz-térfogata (számított)	V_0	cm^3								
Oldat koncentrációja	C_0	$\mu g \cdot cm^{-3}$								
Ekvilibrációs idő	—	ó								

▼B

	Jele	Mérték-egysége								
Rázatás és centrifugálás után										
A vizsgált anyagnak a vakpróba értékeivel korrigált koncentrációja a vizes fázisban	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Hőmérséklet		°C								
1 g talaj által adszorbeált teszlattyag tömege	$C_{s}^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Regressziós analízis:

A K^{ads}_{F} értéke:

Az l/n értéke:

Regressziói koefficiens. r_2:

A vizsgált anyag megnevezése:

A vizsgált talaj:

A talaj szárazanyag-tartalma (105 °C, 12 óra): ..... %

Hőmérséklet: ..... °C

Az alkalmazott analitikai módszertan: Közvetett ☐ Párhuzamos ☐ „Folytatásos” ☐

Közvetlen ☐

Deszorpciós vizsgálat

		Jele	Mérték-egysége	Időinter-vallum	Időinter-vallum	Időinter-vallum	Időinter-vallum
Az adszorpciós lépésből kapott próbacső száma							
A talajon adszorbeált vizsgált anyag tömege, adszorpciós egyensúlyi helyzetben		$m_{s}^{ads}(eq)$	µg				
A 0,01 M 0,01 M $CaCl_2$-oldattal pótolt vizes fázis eltávolított mennyiségének térfogata		V_0 V_R	cm^3				
A talajjal érintkezésben levő vizes fázis összes térfogata	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
A vizsgált anyagnak az adszorpciós egyensúlyi helyzet elérését követően, a tökéletlen térfogat helyettesítés miatt fennmaradt tömege		m_{aq}^{A}	µg				
Deszorpciós kinetika							
A t_i időpontban a talajból deszorbeálódott vizsgált anyag tömege (számított érték)		$m_{m}^{des}(t_i)$	µg				
Az (i) kémcsőből a vizsgált anyag mérése	PM	V^{i}_{r}	cm!				
	SM	V^{D}_{a}	cm^3				
A t_i időpontban a talajból deszorbeálódott vizsgált anyag tömege (számított érték)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
A Δti időintervallumban a talajból deszorbeálódott vizsgált anyag tömege (számított érték)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Jele	Mérték-egysége	Időinter-vallum	Időinter-vallum	Időinter-vallum	Időinter-vallum
Deszorpciós százalék						
Deszorpció a t_i időpontban	D_{ti}	%				
Deszorpció a Δt_i idóintervallumban	$D_{\Delta t_i}$	%				
Látszólagos deszorpciós koefficiens	K_{des}					

PM: = párhuzamos módszer

SM: = folytatásos módszer

▼B

C.19. **ADSZORPCIÓS EGYÜTTHATÓ BECSLÉSE TALAJON ÉS SZENNYVÍZISZAPON NAGYHATÉKONYSÁGÚ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁVAL (HPLC)**

1. **MÓDSZER**

E módszer megfelel az OECD TG121-nek (2001).

1.1. BEVEZETÉS

Anyagok talajokon és szennyvíziszapokon mutatott szorpciós (megkötődési) viselkedését a C.18 vizsgálati módszer használatával kísérletileg meghatározott paraméterek révén lehet leírni. Az egyik fontos paraméter az adszorpciós koefficiens, amely az adott anyagnak talajban/iszapban fennálló koncentrációja és ugyanazon anyag vizes fázisban, adszorpciós egyensúlyi helyzetben rögzíthető koncentrációja közötti arányként fejezhető ki. A talaj K_{oc} szervesszén-tartalmára vonatkoztatott adszorpciós koefficiens megmutatja, hogy a vegyi anyag mennyire képes kötődni a talaj vagy a szennyvíziszap szervesanyag-tartalmához, és lehetővé teszi az összehasonlítást különböző vegyi anyagok között. E paraméter értékét a vízoldhatóság és az n-oktanol/víz megoszlási koefficiens közötti korreláció révén lehet megbecsülni (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Az e vizsgálatban leírt kísérleti módszer nagyhatékonyságú folyadékkromatográfot (HPLC) használ a talajokon és szennyvíziszapokon mutatott K_{oc} adszorpciós koefficiens becsléséhez (8). A becsült eredmények megbízhatóbbak a QSAR módszerrel (9) kaphatóknál. Becslési módszer lévén nem képes teljeskörűen kiváltani a C.18 vizsgálati módszer esetében használt tömeges egyensúlyi kísérleteket. A K_{oc} becsült értékének ismerete azonban hasznos lehet a C.18 módszernek megfelelően végzendő adszorpciós/deszorpciós vizsgálatokhoz szükséges, megfelelő vizsgálati paraméterek kiválasztásakor, a K_d (megoszlási koefficiens) vagy a K_f (Freundlich-féle adszorpciós koefficiens) értékének a 3. egyenlet szerinti kiszámításánál (lásd 1.2. szakasz).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

K_d: a megoszlási koefficiens (szilárd anyag/víz) egy olyan vizsgált anyag „C” egyensúlyi koncentrációértékeinek az arányaként fejezhető ki, amely anyagot egy szorbensből (talaj vagy szennyvíziszap) és egy vizes fázisból álló, kétfázisú rendszerben oldanak fel; ez egy dimenzió nélküli érték, mivel a koncentráció értékét mindkét fázisban tömeg/tömeg fejezik ki. Ha a koncentráció vizes fázisbeli értékét tömeg/térfogat alapon adják meg, akkor a mértékegység ml/g^{-1}. A K_d értéke a szorbens anyag tulajdonságaitól függően változhat, és függhet a koncentrációtól.

$$K_d = \frac{C_{talaj}}{C_{aq}} \; vagy \; \frac{C_{iszap}}{C_{aq}} \qquad (1)$$

ahol:

C_{talaj} = talajban lévő vizsgált anyag koncentrációja egyensúlyi helyzetben ($\mu g.g^{-1}$)

C_{iszap} = az iszapban lévő vizsgált anyag koncentrációja egyensúlyi helyzetben ($\mu g.g^{-1}$)

C_{aq} = a vizes fázisban lévű vizsgált anyag koncentrációja egyensúlyi helyzetben ($\mu g.g^{-1}$, $\mu g.ml^{-1}$).

▼B

K_f: a Freundlich-féle adszorpciós koefficiens a vizsgált anyag talajban vagy szennyvíziszapban mért (x/m) koncentrációjaként határozható meg, akkor, amikor az C_{aq} egyensúlyi koncentráció a vizes fázisban l-gyel egyenlő; a mértékegység $mg.g^{-1}$ szorbens. Ez az érték a szorbens anyag tulajdonságaival együtt változhat.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

ahol:

x/m = egyensúlyi helyzetben lévő szorbens anyag m (gramm) mennyiségében elnyelt vizsgált anyag x mennyisége (mg)

l/n = a Freundlich-féle adszorpciós izoterma meredeksége

C_{aq} = a vizsgált anyag koncentrációja vizes fázisban egyensúlyi helyzetben ($\mu g.ml^{-1}$)

$$AtC_{aq} = 1;\ \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}= a szorbens anyag szervesszén-tartalmában (f_{oc}) kifejezett K_d megoszlási koefficiens vagy K_f Freundlich-féle adszorpciós koefficiens; különösen a nem ionos vegyi anyagok esetében ez egy közelítő pontosságú jelzőszáma az anyag és a szorbens közti adszorpció mértékének, és összehasonlításokat tesz lehetővé különböző vegyi anyagok között. A K_d és K_f mértékegységétől függően a K_{oc} dimenzió nélküli érték lehet, vagy mg × g^{-1} vagy mg × mf^{1} szerves anyag mértékegységgel fejezhető ki.

$$Koc = \frac{Kd}{foc}\left(\text{dimenzió nélküli vagy ml} \cdot g^{-1}\right) \text{vagy } \frac{Kf}{foc}\left(\mu g \cdot g^{-1}\right) \quad (3)$$

A K_{oc} és K_d közötti összefüggés nem mindig lineáris, és ezért a K_{oc} értékei talajonként változhatnak, azonban változékonyságuk a K_d vagy a K_f értékeihez képest kis mértékű.

A K_{oc} adszorpciós koefficiens a (k) kapacitási faktorból vezethető le, felhasználva a kiválasztott referenciavegyületekből levezetett log k' / log K_{oc} kalibrációs görbét.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

ahol:

t_R = a vizsgált- és referenciaanyagok HPLC-s retenciós ideje {perc}

t_0 = a HPLC holtideje (perc) (lásd 1.8.2. szakasz)

P_{OW}: Az oktanol/víz megoszlási koefficiens az n-oktanolban és vízben lévő oldott anyag koncentrációértékeinek az arányaként fejezhető ki: ez dimenzió nélküli érték.

$$P_{ow} = \frac{C_{oktanol}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

1.3. REFERENCIAANYAGOK

A módszer használata előtt meg kell ismerni az anyag szerkezeti képletét, tisztaságát és disszociációs állandóját (ha ez értelmezhető). A vízben és szerves oldószerekben való oldhatóságra, az oktanol/víz megoszlási koefficiensre és a hidrolízis során mutatott tulajdonságokra vonatkozó információk ismerete is hasznos.

▼B

Ahhoz, hogy meg lehessen állapítani egy vizsgált anyag mért HPLC-retenciósidő-adatai és K_{oc} adszorpciós koefficiense közötti korrelációt, előbb meg kell szerkeszteni a log k' / log K_{oc} kalibrációs görbét. Ehhez legalább hat referenciapontot kell használni, egyet-egyet a vizsgált anyag várt értéke alatt, illetve fölött kiválasztva. A módszer pontossága lényegesen javul, ha olyan referenciaanyagokat használnak, amelyek szerkezetüket tekintve hasonlóak a vizsgált anyaghoz. Ha ilyen adatok nem állnak rendelkezésre, akkor a felhasználónak kell kiválasztania a megfelelő kalibrációs anyagokat. Ebben az esetben általánosabb, strukturálisan heterogén anyagokat kell kiválasztani. A javasolt referenciaanyagok és ezek K_{oc}-értékeinek jegyzéke a függelékben található, az 1. táblázatban a szennyvíziszapra, illetve a 3. táblázatban a talajra vonatkozóan. Más kalibrációs anyagok kiválasztását meg kell indokolni.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A HPLC módszerhez a kereskedelemben kapható és lipofil és poláros oldalláncokat tartalmazó cianopropil szilárd fázissal töltött analitikai kolonnákat használnak. Közepesen poláris, szilika alapú állófázis használatos:

–O -Si	$–CH_2 – CH_2 – CH_2$	–CN
szilika	nem poláris közeg	poláris oldallánc

A vizsgálati módszer alapelve hasonló az A.8. módszerhez (megoszlási koefficiens, HPLC módszer). Miközben a vizsgált anyag a mozgófázissal együtt végighalad a kolonnán, a vizsgált anyag reakcióba lép az állófázissal. A mozgó- és állófázis közötti megoszlás eredményeként a vizsgált anyag késleltetetten jelenik meg. A poláris és nem poláris kötőhelyekkel egyaránt rendelkező állófázis kettős összetétele lehetővé teszi a reakció létrejöttét egy adott molekula poláris és nem poláris csoportjaival, hasonló módon ahhoz, ahogyan ez a talaj és a szennyvíziszap mátrixokban lévő szerves anyagoknál is lezajlik. Mindez lehetővé teszi a kolonnánál tapasztalt retenciós idő és a szerves anyag adszorpciós koefficiens közötti összefüggés megállapítását.

A pH-érték komoly hatást gyakorol a szorpciós viselkedésre, különösen a poláris anyagok esetében. A mezőgazdasági hasznosítású talajokban vagy a szennyvíztisztítók tartályaiban a pH-érték általában 5,5 és 7,5 között ingadozik. Az ionképző anyagokra nézve kétféle vizsgálatot kell elvégezni, megfelelő pufferoldatokban mind az ionizált, mind a nem ionizált változattal, de csak olyan esetekben, amikor a vizsgált vegyület legalább 10 százaléka disszociálódik az 5,5–7,5 pH-érték tartományon belül.

Mivel az értékelés céljaira csak a HPLC kolonnában való retenció és az adszorpciós koefficiens közötti összefüggést használják, nincs szükség kvantitatív analitikai módszerre, és csak a retenciós időt kell meghatározni. Ha rendelkezésre áll a referenciaanyagok egy megfelelő készlete és szabványos kísérleti feltételeket biztosítani lehet, akkor a módszer gyors és hatékony módot kínál a K_{oc} adszorpciós koefficiens becsléséhez.

1.5. A VIZSGÁLAT ALKALMAZHATÓSÁGA

A HPCL módszer olyan (jelölt vagy jelöletlen) kémiai anyagok esetében alkalmazható, amelyekre nézve egy megfelelő észlelési rendszer (pl. spektrofotométer, radioaktivitás érzékelő) áll rendelkezésre, és amelyek kellően stabilak a kísérlet végrehajtása alatt. Különösen hasznos lehet e módszer olyan vegyi anyagok esetében, amelyeket nehéz tanulmányozni másfajta kísérleti rendszerekkel (azaz illékony anyagok; olyan anyagok, amelyek nem oldódnak vízben olyan koncentrációban, amit analitikus módszerekkel már mérni lehetne; anyagok, amelyek nagyfokú affinitást mutatnak az inkubációs rendszerek belső felületeivel). A módszer használható olyan elegyek esetében, amelyek nem adnak szétváló elúciós sávokat. Ilyen esetben a vizsgált anyagkeverék vegyületei log K_{oc} értékeinek a felső és alsó határértékeit meg kell adni.

▼B

A szennyeződések olykor megnehezíthetik a HPLC eredmények értelmezését, azonban jelentőségük csekély marad mindaddig, amíg a vizsgált anyagot analitikai módszerekkel egyértelműen be lehet azonosítani és el lehet különíteni a szennyező anyagoktól.

A módszert a függelék 1. táblázatában felsorolt anyagokra validálták, és már alkalmazták egy sor további, az alábbi vegyületcsoportokba sorolt vegyi anyagokra nézve:

— aromás aminok (pl. trifluralin, 4-klór-nilin, 3,5-dinitroanilin, 4-metilanilin, N-metilanilin, 1-naftilamin),

— aromás karboxilsavészterek (pl. benzoesavas metilészter, 3,5-dinitrobenzoesavas etilészter),

— aromás szénhidrogének (pl. toluol, xilol, etilbenzol, nitrobenzol),

— aryloxyphenoxypropionsav észterek (pl. diclofop-metil, fenoxaprop-etil, fenoxaprop-P-etil),

— benzimidazol és imidazol fungicidek (pl. karbendazim, fuberidazol, triazoxid),

— karboxilsavamidok (pl. 2-klórbenzamid, N, N-dimetilbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, N-metilbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid),

— klórozott szénhidrogének (pl. endoszulfán, DDT, hexaklorobenzol, quintozol, 1,2,3-triklórbenzol),

— szerves foszfortartalmú rovarirtók (pl. azinfosz-metil, disulfoton, fenamifosz, izofenfosz, pirozofosz, sulprofosz, triazofosz),

— fenolok (pl. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaklórfenol, 2,4,6-triklórfenol, 1-naftol),

— fenilurea-származékok (pl. izoproturon, monolinuron, pencycuron),

— pigment festékanyagok (pl. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81),

— poliaromás szénhidrogének (pl. acenaftén, naftalin),

— 1,3,5-triazin gyomirtók (pl. prometrin, propazin, simazin, terbutrin),

— triazolszármazékok (pl. tebukonazol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

A módszer nem alkalmazható olyan anyagokra, amelyek akár az eluenssel, akár az állófázissal reakcióba lépnek. Ugyancsak nem alkalmazható olyan anyagokra, amelyek különleges módon lépnek reakcióba a szervetlen komponensekkel (pl. komplexképzés az anyagásványokkal). A módszer nem feltétlenül működik felületaktív anyagok, szervetlen vegyületek és közepesen erős vagy erős szerves savak és bázisok esetén. Az 1,5-től 5-ig terjedő log K_{oc} értékek határozhatók meg. Ionizálható anyagokat pufferolt mozgófázis használatával kell mérni, de óvatosan kell eljárni, hogy elkerüljék a puffer komponensek vagy a vizsgált anyag kicsapódását.

▼B

1.6. MINŐSÉGI KRITÉRIUMOK

1.6.1. **Pontosság**

Egy adott vizsgált anyag adszorpciós koefficiensét általában az egyensúlyi módszerrel (lásd a függelék 1. táblázata) meghatározott érték ± 0,5 log egységen belüli pontossággal lehet becsülni. Nagyobb pontosságot akkor lehet elérni, ha a referenciaanyagok strukturálisan rokonságban állnak a vizsgált anyaggal.

1.6.2. **Megismételhetőség**

Az értékek meghatározását legalább kétszer el kell végezni. Az egyedi mérésekből származtatott log K_{oc} értékeknek a 0,25 log egység tartományon belül kell maradniuk.

1.6.3. **Reprodukálhatóság**

A módszer alkalmazásával eddig nyert tapasztalatok alátámasztják a módszer validitását. A HPLC módszer vizsgálata, amelyhez 48 olyan anyagot (főként peszticideket) használtak fel, amelyekre nézve megbízható adatok álltak rendelkezésre a talajon mért K_{oc} értékekről, R = 0,95 korrelációs koefficienset eredményezett (10) (11).

11 laboratórium bevonásával elvégzett összehasonlító vizsgálatra került sor a módszer tökéletesítése és validitása érdekében (12). Az eredményeket a függelék 2. táblázata tartalmazza.

1.7. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.7.1. **Az adszorpciós koefficiens előzetes becslése**

A P_{ow} (= K_{ow}) oktanol/víz megoszlási koefficiens és – bizonyos mértékig – a vízoldhatóság az adszorpció mértékének jelzőszámaiként használhatók fel, különösen a nem ionos anyagok esetében, s ennélfogva az értéktartományok előzetes behatárolására alkalmazhatók. A vegyi anyagok több csoportjára vonatkozóan is publikáltak már különféle hasznos korrelációkat (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Készülék**

Egy pulzálásmentes pumpával és egy alkalmas érzékelő készülékkel felszerelt folyadékkromatográfra van szükség. Javasolt egy injektáló hurokvezetékkel felszerelt szelep használata. Kémiailag kötött kereskedelmi cyanopropil szilika alapú töltet használata javasolt (pl. Hipersil és Zorbax CN). Az injektáló rendszer és az analitikai kolonna közé egy, azonos anyagtöltetű előtétoszlopot lehet elhelyezni. A különféle szállítóktól származó kolonnák szétválasztási képessége jelentősen eltérhet egymástól. Iránymutatásként, a következő k' kapacitási faktorokkal rendelkezzen: log k' > 0,0 a log K_{oc} = 3,0, valamint log k' > 0,4 a log K_{oc} = 2,0 érték esetében, ha mozgófázisként metanol és víz 55:45 arányú keverékét használják.

1.7.3. **Mozgófázis**

A már vizsgált többféle mozgófázis közül a következő kettő használata ajánlott:

— metanol/víz (55:45 v/v),

— metanol/0,01 M citrátpuffer, pH-érték 6,0 (55:45 v/v).

▼B

Az elúciós oldat elkészítéséhez HPLC-minőségű metanol és desztillált víz vagy citrátpuffer használatos. A keveréket használat előtt gázmentesíteni kell. Izokratikus elúciót célszerű alkalmazni. Ha a metanol/víz elegy nem felel meg a célnak, ki lehet próbálni más szerves oldószerek és víz keverékeit, pl. etanol/víz vagy acetonitril/víz keverékeket. Az ionizálható vegyületek esetében pufferoldat használata javasolt a pH-érték stabilizálása érdekében. Ügyelni kell az egyes szerves fázis/puffer keverékek esetében esetleg előforduló csapadék/sókicsapódás és a kolonnatöltet minőségromlásának elkerülésére.

Nem szabad adalékanyagokat (pl. ion-pár reagenseket) használni, mert ezek hatással lehetnek az állófázis szorpciós képességeire. Az állófázis ilyen változásai pedig irreverzibilisek lehetnek. Emiatt az adalékanyagok használatával járó kísérleteket kötelezően külön kolonnában kell végrehajtani.

1.7.4. **Oldott anyagok**

A vizsgált és referenciaanyagokat a mozgó fázisban kell feloldani.

1.8 A VIZSGÁLAT VÉGREHAJTÁSA

1.8.1. **Vizsgálati körülmények**

A mérések során fel kell jegyezni a hőmérsékletet. Hangsúlyozottan javasolt a szabályozott hőmérsékletű oszlop használata, hogy biztosítható legyen a kísérleti körülmények állandó értéken tartása a kalibrációs és becslési műveletek, valamint a vizsgált anyag mérései során.

1.8.2. **A to holtidő meghatározása**

A to holtidő meghatározására két különböző módszer használható (lásd még 1.2. szakasz).

1.8.2.1. *A to holtidő meghatározása egy homológ sor segítségével*

Erről az eljárásról bebizonyosodott, hogy megbízható és szabványos to értékeket eredményez. A részleteket lásd az A.8 vizsgálati módszernél: n-oktanol/víz megoszlási koefficiens, HPLC módszer.

1.8.2.2. *A to holtidő meghatározása olyan inert anyagok által, amelyeknél a kolonnán való áthaladás során nem lép fel retenció*

Ez az eljárás a formamid, urea vagy nátrium-nitrát alapú oldatok befecskendezésén alapul. A méréseket legalább kétszer el kell végezni.

1.8.3 **A tR retenciós idő meghatározása**

A referenciaanyagokat az 1.3. szakaszban leírtaknak megfelelően kell kiválasztani. Retenciós idejük meghatározása érdekében ezeket keverékstandardként lehet beinjektálni, feltéve, hogy bizonyítható, hogy az egyes referenciaanyagok retenciós idejét nem befolyásolja más referenciaanyagok jelenléte. A kalibrálást rendszeres időközönként, naponta legalább kétszer meg kell ismételni, hogy számításba lehessen venni a kolonna teljesítményében esetleg bekövetkező váratlan változásokat. Az a legjobb gyakorlat, ha a kalibrációs célú injektálásokat a vizsgált anyag beinjektálása előtt és után végzik el, azt megerősítendő, hogy a retenciós időtartamok változatlanok. A kolonnák túlterhelésének megelőzése érdekében a vizsgált anyagokat a lehető legkisebb adagokban kell egymástól elkülönítetten beinjektálni, és retenciós idejüket ezután kell meghatározni.

▼B

A mérések megbízhatósága fokozásának érdekében az értékek meghatározását legalább kétszer meg kell ismételni. Az egyedi mérési adatokból származtatott log K_{oc} értékeknek egy 0,25 log egység tartományba kell esniük.

1.8.4. **Értékelés**

A k' kapacitási faktorokat a kiválasztott referenciaanyagok to holtidejéből és tR retenciós idejéből, a 4. egyenlet használatával kell kiszámolni (lásd 1.2. szakasz). A referenciaanyagok log k adatait ekkor a függelék 1. és 3. táblázatában megadott egyensúlyi kísérletekből levezetett log K_{oc} értékekhez viszonyítva kell grafikusan ábrázolni. A grafikon segítségével ekkor a vizsgált anyag log k' értékét lehet felhasználni a log K_{oc} értékének meghatározásához. Ha a ténylegesen kapott eredmények azt mutatják, hogy a vizsgált anyag log K_{oc} értékei kívül esnek a kalibrációs tartományon, akkor a vizsgálatot más, a célnak jobban megfelelő referenciaanyagok használatával meg kell ismételni.

2. **ADATOK ÉS JELENTÉSKÉSZÍTÉS**

A vizsgálati jelentésben a következő információknak kell szerepelniük:

— a vizsgált anyagok és referenciaanyagok megnevezése, tisztaságuk, valamint – adott esetben – pKa értékeik megjelölése,

— a műszer leírása és a vizsgálati körülmények, pl. az analitikai (és az előtét-) kolonnák típusa és méretei, az észlelés eszközei, a mozgófázis (a komponensek aránya és pH-érték közötti kapcsolat), a mérések hőmérséklet-tartománya,

— holtidő és a holtidő meghatározására használt módszer,

— a kolonnába beadagolt vizsgált anyagok és referenciaanyagok mennyisége,

— a kalibráció céljára felhasznált referenciavegyületek retenciós ideje,

— a regresszió egyenes jellemzői (log k' és log K_{oc} között) és a regressziós egyenes grafikonja,

— a vizsgált vegyület átlagos retenciós adatai és becsült log K_{oc} értéke,

— kromatogramok.

3. **SZAKIRODALOM**

(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 (Koc) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 167.

(3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D. W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297-312.

▼B

(6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831-832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 833-846.

(8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pp. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 285-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

függelék

1. Táblázat

A talajokra és szennyvíziszapokra vonatkozó K_{oc} értékek és a HPLC kiválasztási módszerrel számított értékek összehasonlítása ([1]), ([2])

Anyag megnevezése	CAS-szám	Log K_{oc} szennyvíziszapoknál	HPLC	Δ	Log K_{oc} talajoknál	HPLC	Δ
Atrazine	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
Fenthion	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
Benzoesavas fenilészter	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
Acetanilid	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilin	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Diklóranilin	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121 – 128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107 – 119.

2. Táblázat

A HPLC módszer tökéletesítése és validálása érdekében 11 részt vevő laboratórium által végzett összehasonlító vizsgálatok eredményei ([1])

		Log K_{oc}	K_{oc}	Log K_{oc}
		(OECD 106)	(HPLC módszer)	
Atrazine	1912-24-9	1,81	78 ±16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2062 ±64 8	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.o.

▼B

3. Táblázat

Ajánlott referenciaanyagok a talaj adszorpciós adatokra alapozott HPLC kiválasztási módszer alkalmazásához

Referenciaanyag megnevezése	CAS-szám	Log K_{oc} átlag-értékek az egyen-súlyi vizsgálatból	A K_{oc} ad at ok száma	Log S. D.	Forrás
Acetanilide	103-84-4	1,25	4	0,48	[a]
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	[a]
2-nitrobenzamid	610-15-1	1,45	3	0,90	[b]
N, N-dimetilbenzamid	611-74-5	1,52	2	0,45	[a]
4-metilbenzamid	619-55-6	1,78	3	1,76	[a]
Metilbenzoát	9 3-58-3	1,80	4	1,08	[a]
Atrazin	1912-24-9	1,81	3	1,08	[c]
lzoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	[c]
3-nitrobenzamid	64 5-09-0	1,95	3	1,31	[b]
Anilin	62-53-3	2,07	4	1,73	[a]
3,5-dinitrobenzamid	121-81-3	2,31	3	1,27	[b]
Karbendazim	1060 5-21-7	2,35	3	1,37	[c]
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	[c]
Triazoxid	724 59-58-6	2,44	3	1,66	[c]
Triazofosz	24017-47-8	2,55	3	1,78	[c]
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	[c]
Naftalin	91-20-3	2,75	4	2,20	[a]
Endoszulfán-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	[c]
Metiokarb	20 32-65-7	3,10	4	2,39	[c]
Acid Yellow 219	6340 5-85-6	3,16	4	2,83	[a]
1,2,3-triklórbenzol	87-61-6	3,16	4	1,40	[a]
g-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	[a]
Petition	5 5- 3 8-9	3,31	3	2,49	[c]
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	[a]
Pitrazofosz	13457-18-6	3,65	3	2,70	[c]
a-endoszulfán	959-98-8	4,09	5	3,74	[c]
Diklofop-metil	51538-27-3	4,20	3	3,77	[c]
Fenantrén	8 5-01-8	4,09	4	3,83	[a]
Basic Blue 41 (keverék)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	[a]
DDT	50-29-3	5,63	1	—	[b]

[a] W. W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HLPC. UBA R Report No. 106 01044 (1994).
[b] B. V. Oepen. W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere. 22. pp. 285-304.
[c] Az iparág által szolgáltatott adatok.

▼M7

C.20. *DAPHNIA MAGNÁN* VÉGZETT REPRODUKCIÓS VIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 211. vizsgálati iránymutatásában (2012) leírt módszerrel. Az OECD iránymutatásait időszakonként felülvizsgálják a tudományos fejlődés fényében. A reprodukciós vizsgálatra vonatkozó 211. iránymutatás alapját a 202. vizsgálati iránymutatás (1984) II. része képezi, amely a *Daphnia*-fajok reprodukciós vizsgálatával foglalkozik. Általánosan elismert, hogy az említett 202. vizsgálati iránymutatásnak megfelelően végrehajtott vizsgálatokból nyert adatok eltérőek lehetnek. Ennek nyomán jelentős erőfeszítést tettek e változatosság okainak meghatározása érdekében, egy jobb vizsgálati módszer kidolgozásának céljával. A 211. vizsgálati iránymutatás ezen 1992-ben (1), 1994-ben (2) és 2008-ban (3) folytatott kutatási tevékenység, laboratóriumok közötti összehasonlítás és validálási vizsgálatok eredménye.

A reprodukciós vizsgálati iránymutatás eredeti verziója (202. vizsgálati iránymutatás, 1984) és második verziója (211. vizsgálati iránymutatás, 1998) közötti alapvető különbségek a következők:

— a vizsgálat során használni ajánlott faj a *Daphnia magna*;

— a vizsgálat időtartama 21 nap;

— a félstatikus vizsgálatoknál a vizsgálati koncentrációnként használt állatok száma a legalább 40, lehetőség szerint négy 10-es csoportra osztott egyedről legalább 10, elkülönítve tartott állatra csökken (jóllehet, különböző tervek alkalmazhatók az átfolyásos vizsgálatoknál);

— konkrétabb ajánlások készültek a vizsgálati közeg és az etetési körülmények vonatkozásában.

— a reprodukciós vizsgálati iránymutatás második verziója (211. vizsgálati iránymutatás, 1998) és e verzió közötti alapvető különbségek a következők:

— a szöveg egy 7. függelékkel egészül ki, amely bemutatja az újszülött ivara igény szerinti meghatározásának eljárását. E vizsgálati módszer korábbi verzióival összhangban az ivararány opcionális végpont.

— az egy túlélő szülőre jutó élő utódok hatásváltozójának száma kiegészül egy további, a *Daphnia* szaporodására vonatkozó hatásváltozóval, azaz a vizsgálat elején meglévő egy *Daphnia* szülőre jutó, a vizsgálat végén élő utódok teljes számával, az elemzésből kizárva a szülők baleseti és/vagy véletlenszerű elhullását. E további hatásváltozó hozzáadásának célja, hogy e hatásváltozót összhangba lehessen hozni a gerinctelenekre vonatkozó más reprodukciós vizsgálati módszerekkel. Emellett e hatásváltozóval összefüggésben e vizsgálati módszer keretében lehetőség van egy hibaforrás, azaz a véletlenszerű és/vagy baleseti szülői elhullás kiiktatására, amennyiben bekövetkezik szülői elhullás az expozíciós időszakban.

— a vizsgálati tervre és az eredmények kezelésére vonatkozóan további statisztikai útmutatást foglaltak a szövegbe mind az ECx (pl. EC10 vagy EC50), mind a NOEC/LOEC megközelítés tekintetében.

— határérték-vizsgálat is bevezetésre került

A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

E vizsgálat elsődleges célja annak felmérése, hogy a vegyi anyagok milyen hatást gyakorolnak a *Daphnia magna* reprodukciós teljesítményére. Ebből a célból fiatal, a vizsgálat kezdetekor 24 óránál nem idősebb nőstény *Daphniákat* (a szülőket) a vízhez különféle koncentrációszintekben adagolt vizsgálati vegyi anyag hatásának kell kitenni. A vizsgálat időtartama 21 nap. A vizsgálat végén fel kell mérni az élő utódok teljes számát. A szülők reprodukciós teljesítményét más módokon is ki lehet fejezni (pl. az első utód megjelenésének napjától számítva a naponta egy állatra jutó élő utódok száma), ezt azonban a vizsgálat

▼M7

végén élő utódok teljes száma mellett, kiegészítésként fel kell tüntetni a jelentésben. A félstatikus vizsgálat más, gerinctelenekre vonatkozó reprodukciós vizsgálati módszerekhez képest egyedi kialakítása miatt lehetőség van az egyes szülőkre egyenként jutó élő utódok számának megállapítására is. Ez a gerinctelenekre vonatkozó más reprodukciós vizsgálati módszerekkel szemben lehetővé teszi, hogy amennyiben a szülő balesetszerűen és/vagy véletlenszerűen elpusztul a vizsgálati időszakban, szaporulatát ki lehessen venni az adatok értékeléséből. Így amennyiben szülői elhullás következik be a vegyi anyagnak kitett párhuzamosokban, vizsgálni kell, hogy a mortalitás koncentráció-válasz mintázatot követ-e, azaz hogy a válaszban jelentős regresszió tapasztalható-e a vizsgálati vegyi anyag koncentrációjának függvényében, pozitív meredekség mellett (a Cochran–Armitage-féle trendpróbához hasonló statisztikai vizsgálat alkalmazható erre a célra). Ha a mortalitás nem koncentráció-válasz mintázatot követ, azokat a párhuzamosokat, amelyeknél szülői elhullás tapasztalható, ki kell venni a vizsgálati eredmény elemzéséből. Ha a mortalitás koncentráció-válasz mintázatot követ, a szülői elhullást a vizsgálati vegyi anyag hatásának kell tulajdonítani, és a párhuzamosokat nem szabad kivenni az elemzésből. Ha a vizsgálat során a szülő nem megfelelő bánásmód vagy baleset miatt balesetszerűen, illetve a vizsgálati vegyi anyag hatásával össze nem függő, meg nem magyarázható váratlan esemény következtében véletlenszerűen pusztul el, illetve ha a szülőről kiderül, hogy hímivarú, a párhuzamost ki kell venni az elemzésből (lásd még az 51. pontban). A vizsgálati vegyi anyag reprodukciós teljesítményre gyakorolt toxikus hatását ECx-ben kell megadni úgy, hogy az adatokat nem lineáris regresszióval egy megfelelő modellbe illesztik, hogy meg lehessen becsülni azt a koncentrációt, amely x % csökkenést okoz a reprodukciós teljesítményben; illetve vagylagosan NOEC/LOEC értékben kell kifejezni (4). *A legalacsonyabb használt hatásos koncentrációnak (pl. EC_{10}) lehetőség szerint a vizsgálati koncentrációk tartományain belül kell elhelyezkednie, ami azt jelenti, hogy ezt az értéket interpolációval és nem extrapolációval kell kiszámítani.*

A jelentésben a szülők túlélési arányát és az első ivadékok megjelenésének idejét is fel kell tüntetni. Vizsgálni lehet továbbá a vegyi anyag más paraméterekre pl. a növekedésre (testhossz) gyakorolt hatásait is, és lehetőség szerint a populáció belső növekedési ütemét (lásd a 44. pontot).

A VIZSGÁLATI VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

A *Daphnia magna* fajjal végzett akut toxicitási vizsgálatok eredményei (lásd e melléklet C.2. fejezetét: *Daphnia*-fajok akut immobilizációs vizsgálata) hasznosak lehetnek a reprodukciós vizsgálatok során a vizsgálati koncentrációk megfelelő tartományának kiválasztásában. Ismerni kell a vizsgálati vegyi anyag vízoldékonyságát és gőznyomását, és a vizsgálati oldatokban lévő vegyi anyag mennyiségi meghatározásához rendelkezni kell egy olyan megbízható analitikai módszerrel, amelynél ismert a visszanyerési hatékonyság és meghatározási határ.

A vizsgálati vegyi anyagra vonatkozó azon információkhoz, amelyek hasznosak lehetnek a vizsgálati körülmények megállapításához, tartozik még a vegyi anyag szerkezeti képlete, tisztasága, fénystabilitása, stabilitása vizsgálati körülmények között, a pK_a és P_{ow} értékek, valamint a biológiai lebonthatóságra vonatkozó vizsgálat eredményei is (lásd e melléklet C.4. fejezetét a gyors biológiai lebonthatóság meghatározásáról, illetve a C.29. fejezetet a gyors biológiai lebonthatóságról – CO_2 légmentesen lezárt edényekben).

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

A vizsgálat érvényességéhez az alábbi teljesítménykritériumoknak kell teljesülniük a kontrollcsoport(ok)ban:

— a vizsgálat végén a szülők (nőstény *Daphnia*) mortalitása nem haladja meg a 20 %-ot,

— a vizsgálat végén még élő szülők élő szaporulatának átlagos száma ≥ 60.

Megjegyzés: Ugyanez az érvényességi kritérium (20 %) alkalmazható a baleseti és véletlenszerű szülői elhullásra a kontrollcsoportokban, valamint a vizsgálati koncentrációk mindegyike tekintetében.

▼M7

A MÓDSZER ISMERTETÉSE

Felszerelés

A vizsgálati edények és minden más, a vizsgálati oldatokkal közvetlenül érintkező más felszerelések üvegből vagy más, kémiailag közömbös anyagból készülnek. A vizsgálati edények általában üveglombikok.

Ezenfelül szükség lehet az alábbi berendezések némelyikére vagy mindegyikére:

— oxigénmérő (mikroelektróddal vagy más olyan berendezéssel, amelynek a rendeltetése oldott oxigén mérése csekély mennyiségű mintában);

— megfelelő hőmérséklet-szabályozó készülék;

— pH-mérő;

— a vízkeménységet meghatározó készülékek;

— a víz teljes szervesszén-tartalmának (TOC) vagy a kémiai oxigénigénynek (KOI) a meghatározására alkalmas készülékek;

— megfelelő berendezés a fény szabályozására és intenzitásának mérésére.

Vizsgálati szervezet

A vizsgálat során használandó állatfaj a *Daphnia magna* Straus ([1]).

A klónt lehetőleg genotípusos meghatározással kell beazonosítani. Kutatások (1) kimutatták, hogy az A. Klón (amely a franciaországi IRCHA-ból származik) (5) reprodukciós teljesítménye következetesen kielégíti az e vizsgálati módszerben leírt feltételek mellett tenyésztett, a vizsgálatot túlélő egyes szülőkre átlagosan jutó $\geq$ 60 utód érvényességi kritériumot. Emellett azonban más klónok is elfogadhatók, feltéve, hogy a *Daphnia* tenyészetről kimutatható, hogy kielégíti a vizsgálat érvényességi kritériumait.

A vizsgálat kezdetekor az állatok nem lehetnek 24 óránál idősebbek, és nem származhatnak az első szaporulatból. Egészséges törzstenyészetből kell származniuk (azaz nem szabad stressz jeleit mutatniuk, ilyen például magas mortalitás, hímek és ephippiumok jelenléte, az első szaporulat késedelme, színtelen állatok stb.). A törzstenyészet állatait a vizsgálat céljaira alkalmazandókhoz hasonló tenyésztési körülmények között kell tartani (megvilágítás, hőmérséklet, közeg, táplálék és állatok mennyisége térfogategységre számolva). Ha a vizsgálat során használandó tenyészközeg jellemzői eltérnek azon közeg jellemzőitől, amelyben a *Daphniákat* szokásos módon tenyésztik, akkor helyénvaló egy szokásosan mintegy háromhetes akklimatizációs időszak biztosítása a vizsgálat előtt (azaz egy generációnyi idő), a szülők stresszmentesítése érdekében.

Vizsgálati közeg

Javasolt egy teljes körűen meghatározott közeg használata a vizsgálat során. Így elkerülhető az adalékanyagok (pl. alga, talajkivonatok) használata, amelyeket nehéz jellemezni, és mindez elősegíti a laboratóriumok közötti szabványosítás lehetőségét. E célra az Elendt M4 (6) és M7 közeg (lásd a 2. függeléket) bizonyult alkalmasnak. Azonban másfajta közegek (pl. (7) és (8)) is elfogadhatók, feltéve, hogy a *Daphnia* tenyészet teljesítménye bizonyíthatóan kielégíti a vizsgálat érvényességi kritériumait.

([1]) Más *Daphnia*-fajokat is fel lehet használni, feltéve, hogy azok kielégítik a megfelelő érvényességi kritériumokat (a kontrollcsoportban a reproduktív teljesítményre vonatkozó érvényességi kritérium *valamennyi* fajra alkalmazandó). Más *Daphnia*-fajok használata esetén ezeket egyértelműen azonosítani kell, és alkalmazásukat meg kell indokolni.

▼M7

Nem definiált adalékanyagokat tartalmazó közegek használata esetén az ilyen adalékanyagokat egyértelműen meg kell határozni, és információkat kell adni a Vizsgálati jegyzőkönyvben az összetételükről és különösen a széntartalmukról, mert az hozzájárulhat az alkalmazott etetéshez. Javasolt a szerves adalékanyagot tartalmazó törzsoldat teljes szervesszén-tartalmának (TOC) és/vagy a kémiai oxigénigényének (KOI) meghatározása, és annak becslése, hogy ez mennyivel járul hozzá az elkészített vizsgálati közeg TOC/KOI tartalmához. Javasolt továbbá a közeg (algák hozzáadása előtti) TOC szintjét 2 mg/l alatt tartani (9).

Fémtartalmú vegyi anyagok vizsgálatakor fontos annak felismerése, hogy a vizsgálati közeg tulajdonságai (pl. keménységi fok, kelátképző képesség) hatással lehetnek a vizsgálati vegyi anyag toxicitására. Emiatt kívánatos a teljes körűen meghatározott közeg használata. Jelenleg azonban a *Daphnia magna* hosszú távú tenyésztésére alkalmasnak ítélt, teljes körűen meghatározott közeg egyedül az Elendt M4 és M7. Mindkét közeg tartalmaz EDTA kelátképző szert. Az eddigi vizsgálatok (2) kimutatták, hogy – szemben az EDTA-t egyáltalán nem tartalmazó közegekkel – a kadmium „látszólagos toxicitása" általában alacsonyabb, amennyiben a reprodukciós vizsgálatot az M4 és M7 közegben végzik el. Ezért az M4 és M7 használata nem javasolt a fémtartalmú vegyi anyagok vizsgálatához, és célszerű kerülni az ismert kelátképző szereket tartalmazó másfajta közegek használatát is. A fémtartalmú vegyi anyagok vizsgálatához tanácsos alternatív közeg használata, mint pl. az EDTA-t nem tartalmazó, ASTM szerint előállított kemény édes mesterséges víz (9). Az ASTM szerint előállított kemény édes mesterséges víz és a tengerialga-kivonat e keveréke (10) alkalmas a *Daphnia magna* (2) hosszú távú tenyésztésére.

Az oldott oxigén koncentrációját a vizsgálat kezdetekor és a vizsgálat során mindvégig 3 mg/l felett kell tartani. A pH-értéknek a 6–9 közötti tartományba kell esnie, és az nem változhat egyik vizsgálat során sem 1,5 egységnél nagyobb mértékben. Javasolt a 140 mg/l ($CaCO_3$) vízkeménység választása. Az e szintet elérő és ezt meghaladó feltételek mellett elvégzett vizsgálatok bizonyították a reprodukciós teljesítmény összhangját az érvényességi kritériumokkal (11) (12).

Vizsgálati oldatok

A kiválasztott koncentrációknak megfelelő vizsgálati oldatokat rendszerint a törzsoldat hígításával készítik el. A törzsoldatot lehetőleg a vizsgálati vegyi anyagnak a vizsgálati közegbe mechanikai eszközök, pl. keverő, ultrahang vagy más megfelelő módszer segítségével történő bekeverésével vagy hozzákeverésével kell elkészíteni, lehetőség szerint oldószer vagy diszpergálószer felhasználása nélkül. A vizsgálati szervezetek hozzáadása előtt a vizsgálati rendszereket lehetőség szerint annyi ideig kell kitenni a vizsgálati vegyi anyag vizsgálat során alkalmazandó koncentrációinak, amennyi a stabil expozíciós koncentrációk fenntartásának bizonyításához előírt. Ha a vizsgálati vegyi anyag nehezen oldható vízben, az OECD nehezen vizsgálható anyagok kezelésére vonatkozó iránymutatását kell követni (13). Az oldószerek vagy diszpergálószerek használatát kerülni kell, de azokra szükség lehet az adagolás szempontjából megfelelő koncentrációjú törzsoldat elkészítéséhez.

A vizsgálati koncentrációkon kívül egy hígítóvíz-kontrollt (megfelelő párhuzamosokkal) és – ha elkerülhetetlen – egy oldószert tartalmazó kontrollt (megfelelő párhuzamosokkal) kell működtetni. A vizsgálat során csak olyan oldószer vagy diszpergálószer alkalmazható, amely igazoltan nem gyakorol jelentős hatást vagy csak minimális hatást gyakorol a hatásváltozóra. Az alkalmas oldószereket (pl. aceton, etanol, metanol, dimetil-formamid és trietilén-glikol), valamint az alkalmas diszpergálószereket (pl. Cremophor, RH40, 0,01 %-os metilcellulóz és a HCO-40) a (13) irodalom sorolja fel. Amennyiben oldószert vagy diszpergálószert használnak, annak végső koncentrációja nem lehet nagyobb 0,1 ml/l-nél

▼M7

(13), és annak minden vizsgálati edényben azonosnak kell lennie, a hígítóvíz-kontrolltartályt kivéve. Törekedni kell azonban az ilyen oldószerek koncentrációjának minimalizálására.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

Az expozíció körülményei

Időtartam

A vizsgálat időtartama 21 nap.

Betelepítés

A szülőket elkülönítetten tartják, vizsgálati edényenként egyesével, edényenként általában 50–100 ml közegben (a *Daphnia magna* tekintetében; egyes kisebb *Daphnia*-fajok esetében, mint pl. a *Ceriodaphnia dubia*, kisebb mennyiség is elegendő lehet), kivéve, ha a vizsgálathoz átfolyásos vizsgálati tervre van szükség.

Néha szükségessé válhat nagyobb térfogatok használata a vizsgálati vegyi anyag koncentrációjának meghatározására használt analitikai eljárás követelményeinek a teljesítése érdekében, de megengedett a párhuzamosok összevonása is kémiai analízis céljára. Amennyiben 100 ml-nél nagyobb térfogatot használnak, akkor szükségessé válhat a *Daphniá*knak adott tápadag növelése, a megfelelő táplálékmennyiség és az érvényességi kritériumok betartásának biztosítása érdekében.

Kísérlethez felhasznált állatok

A félstatikus vizsgálatok esetében minden egyes koncentrációszintnél legalább tíz, egyedileg elhelyezett állatra, továbbá a kontrollcsoportokban is legalább tíz, egyedileg elhelyezett állatra van szükség.

Az átfolyásos vizsgálatokhoz alkalmasnak bizonyult minden egyes koncentrációszinthez tartozóan negyven állatot négy, egyenként tíz állatból álló csoportba osztani (1). Kisebb számú vizsgálati szervezet is felhasználható, ez esetben koncentrációszintenként minimum 20 állat bevonása javasolt, amelyeket egyenlő létszámban kell elosztani legalább két edényben (pl. négy párhuzamos, egyenként öt darab *Daphniával*). Megjegyzendő, hogy az olyan vizsgálatok során, ahol az állatokat csoportosan tartják, nem zárható ki egyetlen utód sem a statisztikai elemzésből, ha véletlenszerű vagy baleseti szülői elhullás következik be a szaporodást követően, így ezekben az esetekben a reprodukciós teljesítményt a vizsgálat kezdetekor meglévő egy szülőre jutó élő utódok teljes számában kell kifejezni.

A kezelések vizsgálati edények közötti elosztását és a vizsgálati edények összes későbbi kezelését véletlenszerű sorrendben kell végezni. Az ennek elmulasztásából eredő eltéréseket a koncentrációhatásnak lehet tulajdonítani. Különösen igaz ez, ha a kísérleti egységeket kezelési vagy koncentráció szerinti sorrendben vizsgálják, és ekkor egyes, az idővel összefüggő hatások (mint pl. a kezelő személy fáradtsága vagy más jellegű hibák) jelentősebb hatásokat eredményezhetnek magasabb koncentrációknál. Továbbá, ha a vizsgálati eredményeket valószínűsíthetően befolyásolja a vizsgálat egy kezdeti vagy környezeti vonatkozású feltétele – pl. a laboratóriumon belüli elhelyezés –, akkor fontolóra kell venni a vizsgálat leállítását.

Etetés

A félstatikus vizsgálatoknál lehetőleg naponta kell a tápot beadni, de legalább hetente háromszor (azaz a közeg cseréjével megegyezően). Figyelembe kell venni az expozíciós koncentrációk táp hozzáadása okán történő esetleges hígulását, és lehetőség szerint ezt kellő koncentrációjú algaszuszpenziókkal kell elkerülni. Az ettől való eltéréseket (pl. az átfolyásos vizsgálatoknál) jelezni kell.

A vizsgálat során a szülőknek beadott étrendet lehetőleg a következő élő algasejtekből (egy vagy több felhasználásával) kell összeállítani: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (korábban *Selenastrum capricornutum*) és *Desmodesmus subspicatus* (korábban *Scenedesmus subspicatus*). A beadott étrendet az egyes szülőknek biztosítandó szerves szén (C) mennyiségére kell alapozni. Kutatások (14) bizonyították, hogy a *Daphnia magna* esetében a 0,1 és 0,2 mg C/*Daphnia*/nap közötti adagok elegendőek a vizsgálati érvényességi kritériumokat kielégítő megfelelő szaporulatszám eléréséhez. Az adagolást a vizsgálat

▼M7

időtartama alatt vagy egyenletesen lehet végezni, vagy, amennyiben megfelelőbbnek látszik, akkor kezdetben egy alacsonyabb szint alkalmazható, majd az fokozatosan növelhető, figyelembe véve a szülők növekedésének ütemét. Ebben az esetben is az adagolásnak mindenkor meg kell maradnia a 0,1–0,2 mg C/*Daphnia*/nap tartományon belül.

Amennyiben helyettesítő méréseket alkalmaznak (pl. algasejtszám vagy fényelnyelés) a tápadagban szükséges széntartalom adagolása érdekében (célszerűségi okokból, hiszen a széntartalom mérése időigényes elfoglaltság), úgy minden egyes laboratóriumnak ki kell dolgoznia a saját nomogramját, amely az algatenyészet széntartalmával kapcsolatos helyettesítő paraméterekre vonatkozik (lásd a 3. függelékben a nomogramok elkészítéséhez adott tanácsokat). A nomogramokat évente legalább egyszer ellenőrizni kell, vagy még gyakrabban, amennyiben időközben megváltoznak az algatenyészeti feltételek. A széntartalom helyettesítő mérésére a fényelnyelés vizsgálata jobb módszernek bizonyult, mint a sejtek száma (15).

A *Daphniáknak* koncentrált algaszuszpenziót kell adni, hogy minimalizálható legyen az alga tenyészközeg tesztedényekbe átkerülő mennyisége. Algakoncentrátumot centrifugálással lehet nyerni, amit *Daphnia* tenyészközegben történő reszuszpenzió követ.

Megvilágítás

16 órás megvilágítás 15–20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ mértéket meg nem haladó fényerősséggel, amelyet a víz felszínén kell mérni. A luxban kalibrált fénymérő műszereknél a hideg fehér fényre megadott 1 000–1 500 luxos tartomány felel meg az ajánlott 15–20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$-es fényerősségnek.

Hőmérséklet

A vizsgálati közeg hőmérsékletének 18–22 °C között kell lennie. Emellett a hőmérséklet – lehetőség szerint – egyik vizsgálat esetében sem változik e tartományon belül 2 °C-nál nagyobb mértékben (pl. 18–20, 19–21 vagy 20–22 °C) napi szinten. Helyes módszer lehet egy további vizsgálati edényt a hőmérséklet alakulásának nyomon követésére beállítani.

Levegőztetés

A vizsgálati edényeket nem szabad a vizsgálat során levegőztetni.

Vizsgálati terv

Dózisbehatároló vizsgálat

Szükség esetén dózisbehatároló vizsgálatot kell végezni például a vizsgálati vegyi anyag ötfajta koncentrációjával és két párhuzamossal minden egyes kezelt és kontrolltenyészet vonatkozásában. A *Daphnia* és/vagy más vízi szervezetekkel szembeni akut toxicitásra vonatkozó, a hasonló vegyi anyagokkal folytatott vizsgálatokból vagy a szakirodalomból nyert további információ hasznos lehet a dózisbehatároló vizsgálatban alkalmazandó koncentrációk tartományának meghatározásában.

A dózisbehatároló vizsgálat tartama 21 nap vagy a hatásszintek megbízható előrejelzése szempontjából kellően hosszú időtartam. A vizsgálat végén fel kell mérni a *Daphnia* reprodukcióját. Fel kell jegyezni a szülők számát és az utódok megjelenését.

Meghatározó vizsgálat

Szokásos esetben legalább ötfajta, a hatásos koncentrációt (pl. EC_x) magában foglaló vizsgálati koncentrációt kell olyan mértani sorban elrendezni, amelyet 3,2-t meg nem haladó szorzótényező jellemez. Minden vizsgálati koncentrációhoz megfelelő számú párhuzamost kell használni (lásd a 24–25. pontot). Ötnél kevesebb vizsgálati koncentráció használatát indokolni kell. A vegyi anyagokat nem szabad a vizsgálati közegben való oldhatósági határértékük felett vizsgálni. A

▼M7

kísérlet lefolytatása előtt tanácsos a vizsgálati terv statisztikai erejének és a megfelelő statisztikai módszerek használatának figyelembevétele (4). A koncentrációk meghatározása során az alábbiakat kell szem előtt tartani:

i. A reprodukcióra gyakorolt hatásokra vonatkozó EC_x becslésekor tanácsos kellően nagy koncentrációértékeket használni az EC_x megfelelő konfidenciaszinten történő meghatározása érdekében. A becsült EC_x-nek lehetőség szerint a vizsgálati koncentrációk tartományán belül kell elhelyezkednie, így az EC_x-et inkább interpolációval és nem extrapolációval kell megállapítani. A későbbi statisztikai elemzés szempontjából előnyös több vizsgálati koncentrációt (pl. 10-et) és az egyes koncentrációk tekintetében kevesebb párhuzamost alkalmazni (pl. 5-öt, így az edények teljes száma állandó lehet), 10 kontrolltenyészettel.

ii. A LOEC és/vagy NOEC érték becslésekor a legalacsonyabb vizsgálati koncentrációnak kellően alacsonynak kell lennie ahhoz, hogy a reprodukciós teljesítmény e koncentrációnál ne legyen lényegesen alacsonyabb, mint a kontrollcsoportban. Ellenkező esetben a vizsgálatot egy csökkentett legalacsonyabb koncentrációszinten meg kell ismételni.

iii. A LOEC és/vagy NOEC érték becslésekor a legmagasabb vizsgálati koncentrációnak kellően magasnak kell lennie ahhoz, hogy a reprodukciós teljesítmény e koncentrációnál lényegesen alacsonyabb legyen, mint a kontrollcsoportban. Ellenkező esetben a vizsgálatot egy megnövelt legmagasabb koncentrációszinten meg kell ismételni, kivéve, ha az eredeti vizsgálatban legmagasabb vizsgálati koncentrációként a krónikus hatások vizsgálatához szükséges maximális vizsgálati koncentrációt (pl. 10 mg/l) alkalmazták.

Ha a dózisbehatároló vizsgálat során a legmagasabb koncentrációnál (pl. 10 mg/l) nem figyelhetők meg hatások, vagy ha a vizsgálati vegyi anyag a más szervezetekre kifejtett toxicitás hiánya és/vagy alacsony felvétel vagy a felvétel hiánya alapján nagyon valószínűsíthetően alacsony toxicitású vagy nem toxikus, a reprodukciós vizsgálatot határérték-vizsgálatként is el lehet végezni pl. 10 mg/l vizsgálati koncentráció és kontrolltenyészet alkalmazásával. Tíz párhuzamost kell használni mind a kezelt csoport, mind a kontrollcsoport esetében. Ha a határérték-vizsgálatot átfolyásos rendszerben kell elvégezni, kevesebb párhuzamos is elegendő. A határérték-vizsgálat lehetőséget biztosít annak igazolására, hogy a határkoncentrációnál nem áll fenn statisztikailag szignifikáns hatás, ha azonban hatásokat jegyeznek fel, általában teljes vizsgálatra van szükség.

Kontrollcsoportok

A vizsgálati anyaggal kezelt vizsgálati sorozatokkal párhuzamosan a vizsgálati közeg egy kontrollcsoport-sorozatát és – adott esetben – egy, oldószert vagy diszpergálószert tartalmazó kontrollcsoport-sorozatot kell beállítani. Ebben az esetben az oldószer vagy diszpergálószer koncentrációjának meg kell egyeznie a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó edényekben használt koncentrációval. Megfelelő számú párhuzamost kell használni (lásd 23–24. pont).

Egy jól végrehajtott vizsgálat során általában a kontrollcsoportban lévő egy szülőre jutó élő szaporulat variációs koefficiense az átlagos szám körül ≤ 25 %; ezt azon vizsgálati terv esetén kell rögzíteni, ha a szülőket elkülönítve tartják a vizsgálat során.

A vizsgálati közeg megújítása

A közeg megújításának gyakorisága a vizsgálati vegyi anyag stabilitásától függ, azonban hetente legalább három csere szükséges. Amennyiben az előzetes stabilitási vizsgálatok (lásd 7. pont) azt mutatták, hogy a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja nem stabil (azaz kívül esik a névleges koncentráció 80–120 %-os tartományán, vagy a kiinduláskor mért koncentráció 80 %-a alá csökken) a két megújítás közötti maximális időtartam (azaz három nap) alatt, úgy számba kell venni a vizsgálati közeg gyakoribb megújításának lehetőségét vagy egy átfolyásos vizsgálat alkalmazását.

▼M7

Amennyiben a közeget félstatikus vizsgálatok során megújítják, akkor a vizsgálati edényekből egy második sorozatot is be kell állítani, és a szülőket pl. egy megfelelő átmérőjű üvegpipetta segítségével kell áthelyezni. A *Daphniákkal* együtt áthelyezett vizsgálati közeg mennyiségét a minimumra kell csökkenteni.

Megfigyelések

A vizsgálat során tett megfigyelések eredményeit adatlapokon kell rögzíteni (lásd a példákat a 4. és 5. függelékben). Amennyiben más mérések elvégzése is követelmény (lásd 44. pont), akkor további megfigyelések elvégzése is szükséges lehet.

Utódok

Az egyes szülőktől származó utódokat lehetőleg naponta ki kell emelni és meg kell számlálni az első utódnemzedék megjelenésének napjától kezdve, annak megakadályozására, hogy elfogyasszák a szülőknek szánt táplálékot. E módszer alkalmazásában csak az élő utódokat kell megszámlálni, de feljegyezhető az abortált peték és az elhullott utódok száma is.

Mortalitás

Lehetőleg naponta, vagy legalább az utódok megszámlálásával megegyező gyakorisággal fel kell jegyezni a szülő állatok elhullását.

Egyéb paraméterek

Bár e módszert alapvetően a reprodukciós teljesítményre gyakorolt hatások felmérése érdekében dolgozták ki, általa azonban más hatások is kellő részletességgel számszerűsíthetők, statisztikai elemzéseket lehetővé téve. A túlélő szülő reprodukciós teljesítményét, azaz a vizsgálat során túlélő szülőnként született élő utódok számát fel lehet jegyezni. Ezt össze lehet vetni a legfontosabb hatásváltozóval (a vizsgálat kezdetekor meglévő, a vizsgálat során nem véletlen- vagy balesetszerűen elpusztult szülők egyenkénti reprodukciós teljesítményével). Amennyiben szülői elhullás következik be a vegyi anyagnak kitett párhuzamosokban, vizsgálni kell, hogy a mortalitás koncentráció-válasz mintázatot követ-e, azaz hogy a válaszban jelentős regresszió tapasztalható-e a vizsgálati vegyi anyag koncentrációjának függvényében, pozitív meredekség mellett (a Cochran–Armitage-féle trendpróbához hasonló statisztikai vizsgálat alkalmazható erre a célra). Ha a mortalitás nem koncentráció-válasz mintázatot követ, azokat a párhuzamosokat, amelyeknél szülői elhullás tapasztalható, ki kell venni a vizsgálati eredmény elemzéséből. Ha a mortalitás koncentráció-válasz mintázatot követ, a szülői elhullást a vizsgálati vegyi anyag hatásának kell tulajdonítani, és a párhuzamosokat nem szabad kivenni a vizsgálati eredmény elemzéséből. A növekedési ütem mérése igen kívánatos, mert ezzel információk nyerhetők az esetleges szubletális hatásokról, ami hasznos lehet a kizárólag a reprodukciós hatásokra irányuló mérések mellett; a szülők hosszának (azaz a léctüske nélkül mért testhossznak) a mérése javasolt a vizsgálat végén. A többi mérhető vagy számítható paraméter közé tartozik az első utódnemzetség (majd a következő csoportok) megjelenéséig eltelt idő, az egy szülőre jutó utódok száma és mérete, az abortált utódok száma, hím újszülöttek (OECD, 2008) vagy ephippia jelenléte és lehetőség szerint a populáció belső növekedési üteme (a meghatározás tekintetében lásd az 1. függeléket és az újszülöttek ivarának meghatározása tekintetében a 7. függeléket).

Az analitikai meghatározások és mérések gyakorisága

Az oxigénkoncentrációt, a hőmérsékletet, a keménységet és a pH-értékeket hetente legalább egyszer mérni kell, a közeg megújítása előtt és után, a kontrollcsoportokban és a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációit tartalmazó edényekben.

A vizsgálat során szabályos időközönként meg kell határozni a vizsgálati vegyi anyag koncentrációit.

A félstatikus vizsgálatok során, ahol a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja a névleges koncentráció ± 20 százalékos sávján belülre várható (azaz a 80–120 %-os sávon belül; lásd 6., 7. és 39. pont), minimális intézkedésként javasolt a legmagasabb és a legalacsonyabb vizsgálati koncentrációk elemzése frissen elkészített és a megújítás idején meglévő állapotban, a vizsgálat első hete során egy

▼M7

alkalommal (azaz az elemzéseket az azonos oldatból vett mintán kell elvégezni; először, amikor az oldat frissen elkészült, majd a megújítás alkalmával). E meghatározásokat ezt követően legalább hetente egyszer meg kell ismételni.

Az olyan vizsgálatok során, ahol a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja nem várható a névleges koncentráció ± 20 százalékos sávján belülre, elemezni kell az összes vizsgálati koncentrációt a frissen elkészült oldatoknál és a megújítás alkalmával. Azonban az olyan vizsgálatok esetében, ahol a vizsgálati vegyi anyag kezdetkor mért koncentrációja nem marad meg a névleges koncentráció ± 20 százalékos sávján belül, viszont elégséges bizonyíték hozható fel annak bemutatására, hogy a kezdeti koncentrációk megismételhetők és stabilak (azaz a kezdeti koncentrációértékek 80–120 %-os tartományán belül vannak), a kémiai jellegű méréseket a vizsgálat 2. és 3. hetében a legmagasabb és a legalacsonyabb vizsgálati koncentrációk meghatározására lehet lecsökkenteni. Mindegyik esetben a vizsgálati vegyi anyag koncentrációinak a megújítást megelőző meghatározását csak minden egyes vizsgálati koncentráció egyetlen párhuzamos edényén kell elvégezni.

Az átfolyásos vizsgálatok esetében megfelelő a félstatikus vizsgálatoknál leírtakhoz hasonló mintavételi eljárás alkalmazása (azonban a „régi” oldatok mérése nem alkalmazható ezen esetben). Az első hét során azonban tanácsos lehet a mintavételi esetek számát megnövelni (pl. három méréssorozatra), a vizsgálati koncentrációk stabilitásának biztosítása érdekében. Az ilyen típusú vizsgálatok esetében a hígítóvíz és a vizsgálati vegyi anyag átfolyási sebességét naponta kell ellenőrizni.

Amennyiben bizonyítható, hogy a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja a vizsgálat teljes időtartama alatt mindvégig sikeresen a névleges vagy a kezdetkor mért koncentráció ± 20 százalékán belül marad, akkor az eredményeket a névleges vagy a kezdeti mért értékekre lehet alapozni. Ha a névleges vagy a kezdeti mért koncentrációhoz képest az eltérés nagyobb ± 20 százaléknál, akkor az eredményeket az idővel súlyozott átlaghoz képest lehet kifejezni (a számítási útmutatót lásd a 6. függelékben).

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Eredmények feldolgozása

E vizsgálat célja a vizsgálati vegyi anyag által a reprodukciós teljesítményre gyakorolt hatás meghatározása. Az egy szülőre jutó utódok összlétszámát minden egyes vizsgálati edényre (azaz párhuzamosra) nézve ki kell számítani. Ezenfelül a reprodukció kiszámítható a túlélő szülő szervezet élő szaporulata alapján is. Ugyanakkor az ökológiailag leginkább releváns hatásváltozó az azon szülőkre jutó utódok teljes száma, amelyek nem balesetszerűen ([1]) vagy véletlenszerűen ([2]) pusztultak el a vizsgálat során. Ha valamely szülő baleset- vagy véletlenszerűen elpusztul a vizsgálat során, vagy kiderül róla, hogy hím, akkor az ilyen párhuzamost ki kell hagyni az elemzésből. Az elemzést ekkor csökkentett számú párhuzamosra kell alapozni. Amennyiben szülői elhullás következik be a vegyi anyagnak kitett párhuzamosokban, vizsgálni kell, hogy a mortalitás koncentráció-válasz mintázatot követ-e, azaz hogy a válaszban jelentős regresszió tapasztalható-e a vegyi anyag koncentrációjának függvényében, pozitív meredekség mellett (a Cochran-Armitage-féle trendpróbához hasonló statisztikai vizsgálat alkalmazható erre a célra). Ha a mortalitás nem koncentráció-válasz mintázatot követ, azokat a párhuzamosokat, amelyeknél szülői elhullás tapasztalható, ki kell venni a vizsgálati eredmény elemzéséből. Ha a mortalitás koncentráció-válasz mintázatot követ, a szülői elhullást a vizsgálati vegyi anyag hatásának kell tulajdonítani, és a párhuzamosokat nem szabad kivenni a vizsgálati eredmény elemzéséből.

Összegezve, ha a hatásokat LOEC és NOEC vagy EC_x segítségével fejezik ki, ajánlott a reprodukcióra gyakorolt hatást a fent említett mindkét hatásváltozó alkalmazásával kiszámítani, azaz

([1]) Akaratlan elhullás: nem szándékoltan bekövetkező váratlan esemény (azaz ismert ok) által előidézett, a vegyi anyaggal össze nem függő elhullás.

([2]) Véletlen elhullás: ismeretlen okból bekövetkezett, a vegyi anyaggal össze nem függő elhullás.

▼M7

— az azon szülőkre jutó utódok teljes száma alapján, amelyek nem pusztultak el baleset- vagy véletlenszerűen a vizsgálat során; valamint

— a túlélő szülőkre jutó élő utódok száma alapján;

és ezt követően végső eredményként az e két hatásváltozó valamelyikének felhasználásával kiszámított NOEC, LOEC vagy EC_x értéket alkalmazni.

A statisztikai elemzés alkalmazása, pl. ANOVA-eljárások, a kontrollcsoport kezeléseinek Student-féle t-próba, Dunnett-féle próba, Williams-féle próba vagy lefelé lépegető Jonckheere–Terpstra-próba segítségével történő összehasonlítása előtt ajánlott az adatok transzformációját mérlegelni, ha ez szükséges az adott statisztikai vizsgálat követelményeinek való megfelelés érdekében. Nem paraméteres alternatívaként alkalmazható a Dunn-féle vagy a Mann–Whitney-féle próba. 95 %-os konfidencia-intervallumokat kell számítani az egyedi kezelési átlagokhoz.

A túlélő szülők száma a nem kezelt kontrollokban érvényességi kritérium, és azt dokumentálni kell és fel kell tüntetni a jelentésben. Más ártalmas hatásokat, például az abnormális viselkedést és a toxikológiailag szignifikáns megállapításokat a végleges jelentésben is fel kell tüntetni.

ECx

Az ECx értékeket, ideértve az azokhoz tartozó alsó és felső konfidenciahatárokat, a megfelelő statisztikai módszerek segítségével kell kiszámítani (pl. logisztikai vagy Weibull-függvény, csonkolt Spearman–Karber módszer vagy egyszerű interpoláció). Az EC_{10}, EC_{50} vagy bármely más ECx kiszámításához a teljes adatállományt regresszióanalízisnek kell alávetni.

NOEC/LOEC

Ha a statisztikai elemzés célja a NOEC/LOEC meghatározása, megfelelő statisztikai módszereket kell alkalmazni az OECD „Aktuális megközelítések az ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató” című 54. dokumentuma (4) szerint. Általában a vizsgálati vegyi anyag káros hatásait a kontrollal összehasonlítva egyoldali hipotézisvizsgálattal ($p \leq 0,05$) vizsgálják.

A normál eloszlást és a szóródáshomogenitást megfelelő statisztikai próbával pl. Shapiro-Wilk-próbával, illetve Levene-féle próbával ($p \leq 0,05$) lehet tesztelni. Egyirányú ANOVA és azt követően többszörös összehasonlító próbákat lehet végezni. Többszörös összehasonlítással (pl. Dunnett-féle próba) vagy lefelé lépegető trendpróbákkal (pl.: Williams-féle próba vagy lefelé lépegető Jonckheere–-Terpstra-próba) lehet kiszámítani, hogy vannak-e jelentős különbségek ($p \leq 0,05$) a kontrollok és a vizsgálati vegyi anyag különböző koncentrációi között (az ajánlott próbát az OECD 54. útmutató dokumentuma (4) szerint kell kiválasztani). Ellenkező esetben nemparaméteres módszereket (pl. a Holm szerint módosított Bonferroni-féle U-próbát vagy a Jonckheere–Terpstra-féle trendpróbát) kell használni a NOEC és a LOEC meghatározására.

Határérték-vizsgálat

Ha határérték-vizsgálatot (a kontroll és egyetlen kezelés összehasonlítása) végeztek, és a paraméteres vizsgálati eljárások előfeltételei (normalitás, homogenitás) teljesülnek, a metrikus válaszokat a Student-féle próbával (t-próba) lehet értékelni. Ha ezek a feltételek nem teljesülnek, akkor a nem egyenlő varianciákat feltételező t-próba (például Welch-féle próba) vagy egy nemparaméteres próba, például a Mann–Whitney-féle U-próba alkalmazható.

A kontrollok (kontroll és oldószeres vagy diszpergálószeres kontroll) közötti szignifikáns különbségek meghatározása céljából az egyes kontrollok párhuzamosait a határérték-vizsgálatnál leírtak szerint kell vizsgálni. Ha ezek a tesztek nem mutatnak ki szignifikáns eltérést, a kontroll és az oldószeres kontroll párhuzamosait össze lehet vonni. Ellenkező esetben az összes kezelést az oldószeres kontrollal kell összehasonlítani.

▼M7

Vizsgálati jegyzőkönyv

A Vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

— fizikai állapota és releváns fiziko-kémiai tulajdonságai,

— a kémiai azonosítási adatok, beleértve a tisztaságot.

Vizsgálati fajok:

— a klón (meg kell jelölni, ha genetikailag tipizált), a beszállító vagy eredet (amennyiben ismert) és az alkalmazott tenyésztési körülmények; rögzíteni és indokolni kell, ha a *Daphnia magnától* eltérő fajt használnak.

Vizsgálati körülmények

— az alkalmazandó vizsgálati eljárás (pl. félstatikus vagy átfolyásos, térfogat, az egy literre jutó *Daphniák* számában kifejezett betelepítés);

— megvilágítási időszak és fényerősség;

— vizsgálati terv (pl. párhuzamosok száma, párhuzamosonkénti szülőszám);

— a felhasznált tenyészközeg részletes leírása;

— hozzáadott szerves anyagok (amennyiben ilyenre sor kerül), beleértve azok összetételét, eredetét, elkészítési módját, a törzsoldat-készítmények TOC/KOI értékeit, a vizsgálati közegben mutatkozó TOC/KOI becslését;

— részletes információk az etetésről, beleértve a mennyiséget (mg C/*Daphnia*/nap) és az ütemezést (pl. táp(ok) típusa), beleértve az algáknál a speciális elnevezést/fajt, továbbá – amennyiben ismert – a törzset és a tenyésztési körülményeket);

— a törzsoldat elkészítésének módszere és megújításának gyakorisága (az esetleg használt oldószer vagy diszpergálószer megnevezését és koncentrációját meg kell adni).

Eredmények:

— a vizsgálati vegyi anyag stabilitására vonatkozó előzetes vizsgálatok eredményei;

— a névleges vizsgálati koncentrációk és az összes olyan elemzés eredménye, amelyek célja a vizsgálati vegyi anyag vizsgálati edényekben mért koncentrációjának a meghatározása (lásd a mintaadatlapokat az 5. függelékben); az analízis visszanyerési hatékonyságát és a meghatározási határt is fel kell tüntetni a jelentésben;

— a vizsgálati edényekben lévő víz minősége (azaz pH-érték, hőmérséklet, oldottoxigén-koncentráció, TOC és/vagy KOI értékek és keménység, adott esetben) (lásd a mintaadatlapokat a 4. függelékben);

— az élő utódok vizsgálat során történő megjelenésének teljes nyilvántartása minden egyes szülőnél (lásd a mintaadatlapokat a 4. függelékben);

— az elhullott szülők száma és az elhullás bekövetkezésének a napja (lásd a mintaadatlapokat a 4. függelékben);

— a kontrollcsoportbeli reprodukciós teljesítmény variációs koefficiense (a vizsgálat végén élő szülőre jutó élő utódok összlétszámára alapozva);

— az egyes párhuzamosokban az egy szülőre (kivéve a baleset- vagy véletlenszerűen elhullott szülőket) jutó élő utódok teljes számát a vizsgálati vegyi anyag koncentrációjának függvényében ábrázoló grafikon;

▼M7

— adott esetben az egyes párhuzamosokban az egy túlélő szülőre jutó élő utódok teljes számát a vizsgálati vegyi anyag koncentrációjának függvényében ábrázoló grafikon;

— adott esetben a reprodukció szempontjából megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC), ideértve az alkalmazott statisztikai eljárásokat és annak feltüntetését, hogy várhatóan milyen hatást tárnak majd fel (ennek érdekében a kísérlet megkezdése előtt erőelemzést lehet végezni), továbbá a reprodukció szempontjából megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC); azzal kapcsolatos információ, hogy az LOEC és az NOEC kiszámításához melyik hatásváltozót használták (a vizsgálat során baleset- vagy véletlenszerűen el nem pusztult anyai szervezetre jutó élő utódok összes száma, vagy a túlélő anyai szervezetre jutó élő utódok teljes száma), adott esetben a szülők mortalitása tekintetében vett LOEC-t vagy NOEC-t is fel kell tüntetni a jelentésben;

— szükség esetén a reprodukcióra vonatkozó EC_x és a konfidencia-intervallum (pl. 90 % vagy 95 %), valamint a számításhoz használt, illesztett modell grafikonja, a koncentráció-válasz görbe meredeksége és a standard hibája;

— más megfigyelt biológiai hatások vagy mérések: a jelentésben fel kell tüntetni minden megfigyelt vagy mért más jellegű biológiai hatást (pl. szülők növekedése), a megfelelő indoklással együtt;

— az előírt vizsgálati módszertől való bármely eltérés magyarázata.

SZAKIRODALOM

(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). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. 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). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.

(4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.

(5) Baird, D.J., *et al.* (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257-265.

(6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

(7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods

(8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775-782.

(9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

(10) Baird, D.J., *et al.* (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.

▼M7

(11) Parkhurst, B.R., J.L Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1-8.

(12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120 (2): 185-196.

(13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.

(14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058.

(15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

▼M7

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

E vizsgálati módszer alkalmazásában a következő fogalommeghatározások alkalmazandók:

Baleseti elhullás: nem szándékoltan bekövetkező váratlan esemény (azaz ismert ok) által előidézett, a vegyi anyaggal össze nem függő elhullás.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

ECx: a vízben oldott vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a *Daphnia* reprodukciójában x % csökkenést okoz meghatározott expozíciós időszak alatt.

Véletlenszerű elhullás: ismeretlen okból bekövetkezett, a vegyi anyaggal össze nem függő elhullás.

A populáció belső növekedési üteme: a populáció növekedésének mértéke, amely a reprodukciós teljesítményből és a korspecifikus pusztulásból tevődik össze (1) (2) (3). Az egyensúlyi populációk esetében ez pontosan nulla. A növekedő populációknál pozitív, a csökkenő populációknál negatív. Ez utóbbi nyilvánvalóan nem fenntartható, és végül kihaláshoz vezet.

Érzékelési határ: a legalacsonyabb koncentráció, amelyet érzékelni lehet, de számszerűsíteni már nem.

Meghatározási határ: a számszerűsíthetően mérhető legalacsonyabb koncentráció.

Megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC): azon legalacsonyabb vizsgálati koncentráció, amelynél a kontrollcsoporttal összevetve megfigyelhető a vizsgálati vegyi anyag statisztikailag szignifikáns hatása a reprodukcióra és a szülők mortalitására ($p < 0,05$-nél) a megfigyelt expozíciós időszakban. Azonban a LOEC-szint feletti valamennyi vizsgálati koncentrációnak olyan ártalmas hatást kell kifejtenie, amely legalább egyenlő a LOEC-szinten megfigyelttel vagy súlyosabb annál. Amennyiben e két feltétel nem teljesíthető, akkor kimerítő magyarázatot kell adni arra, hogy hogyan történt a LOEC (és ennélfogva a NOEC) kiválasztása.

Mortalitás: egy állat akkor tekinthető kimúltnak, ha mozdulatlan, azaz ha nem képes úszni, vagy ha a tesztedény enyhe rázogatása után 15 másodpercen belül nem figyelhető meg mozgás a függelékben vagy az utóbélben. (Más meghatározás használata esetén ezt a hozzá tartozó irodalmi hivatkozással együtt kell megadni.)

Megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC): a közvetlenül a LOEC alatti vizsgálati koncentráció, amely – a kontrollcsoporttal való összevetésben – nem fejt ki statisztikailag szignifikáns hatást ($p < 0,05$) a meghatározott expozíciós időszak alatt.

Utódok: azon fiatal *Daphnia*-egyedek, amelyek a vizsgálat során születnek a szülőktől.

Szülők: a vizsgálat kezdetén jelen lévő nőstény *Daphnia*-egyedek, amelyek reprodukciós teljesítménye e vizsgálat tárgyát képezi.

Reprodukciós teljesítmény: a vizsgálati időszakban a túlélő szülőkre jutó élő utódok száma.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgálati anyag vagy keverék.

SZAKIRODALOM

(1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

▼M7

(2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.

(3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

▼M7

2. függelék

TELJES KÖRŰEN MEGHATÁROZOTT ELENDT M7 ÉS M4 KÖZEG ELŐÁLLÍTÁSA

Akklimatizálás az Elendt M7 és M4 közeghez

Egyes laboratóriumok nehézségekbe ütköztek, amikor *Daphniát* próbáltak átvinni M4 (1) és M7 közegbe. Fokozatos akklimatizálással, azaz a saját közegből előbb 30, majd 60, végül 100 százalékos Elendt-közegbe való áthelyezéssel azonban némi sikert értek el. Az akklimatizáció akár egy hónapig is eltarthat.

Előkészítés

Nyomelemek

Először megfelelő tisztaságú (azaz deionizált, desztillált vagy fordított ozmózissal előállított) víz felhasználásával egyedi nyomelemeket tartalmazó, különféle törzsoldatokat (I) kell készíteni. E különféle törzsoldatokból (I) egy második, egyetlen törzsoldat (II) készül, amely már tartalmazza az összes nyomelemet (kombinált oldat), azaz:

I. törzsoldat(ok) (egyetlen anyag)	A vízhez adott mennyiség	Koncentráció (az M4 közegre vonatkoztatva)	A II. kombinált törzsoldat elkészítéséhez az I. törzsoldatból az alábbi mennyiséget kell vízhez hozzáadni	
	mg/l		ml/l	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000-szeres	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000-szeres	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-szeres	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-szeres	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000-szeres	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-szeres	1,0	0,25
Mo $Na_2O_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000-szeres	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000-szeres	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-szeres	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000-szeres	1,0	1,0
KI	65	20 000-szeres	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000-szeres	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000-szeres	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000-szeres	—	—
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000-szeres	—	—
Mind a Na_2EDTA, mind a $FeSO_4$ oldatot külön kell elkészíteni, majd összeönteni és azonnal autoklávban kezelni. Ez a következőt eredményezi:				
Fe-EDTA oldat		1 000-szeres	20,0	5,0

▼**M7**

M4 és M7 közeg

Az M4 és M7 közeget a II. törzsoldatból, makroelemekből és vitaminokból kell elkészíteni a következőképpen:

	A vízhez adott mennyiség	Koncentráció (az M4 közegre vonatkoztatva)	A közeg elkészítéséhez hozzáadott törzsoldat mennyisége	
	mg/l		ml/l	
			M4	M7
II. törzsoldat (kombinált nyomelemek)		20-szoros	50	50
Makroelemek törzsoldatai (egyetlen anyag)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000-szeres	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000-szeres	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-szeres	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-szeres	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5 000-szeres	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-szeres	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000-szeres	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-szeres	0,1	0,1
Kombinált vitamintörzsoldat	—	10 000-szeres	0,1	0,1

A kombinált vitamintörzsoldat készítéséhez a 3 vitamint 1 liter vízhez kell adni, a következőképpen:

	mg/l			
Tiamin-hidroklorid	750	10 000-szeres		
Cianokobalamin (B_{12})	10	10 000-szeres		
Biotin	7,5	10 000-szeres		

A kombinált vitamintörzsoldatot kis alikvot mennyiségekben, fagyasztott állapotban kell tartani. A közeghez a vitaminokat röviddel a felhasználás előtt kell hozzáadni.

Megjegyzés: A végleges közeg elkészítésekor a sók kicsapódásának elkerülése érdekében az alikvot törzsoldatokat kb. 500–800 ml deionizált vízhez kell adni, majd a mennyiséget fel kell tölteni 1 literre.

Megjegyzés: Az M4 közegről szóló első publikáció itt található: Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154., 25–33.

▼M7

3. függelék

ÖSSZES SZERVES SZÉN (TOC) MEGHATÁROZÁSA ÉS NOMOGRAM KÉSZÍTÉSE ALGAALAPÚ TÁP TOC-TARTALMÁNAK ÁBRÁZOLÁSÁRA

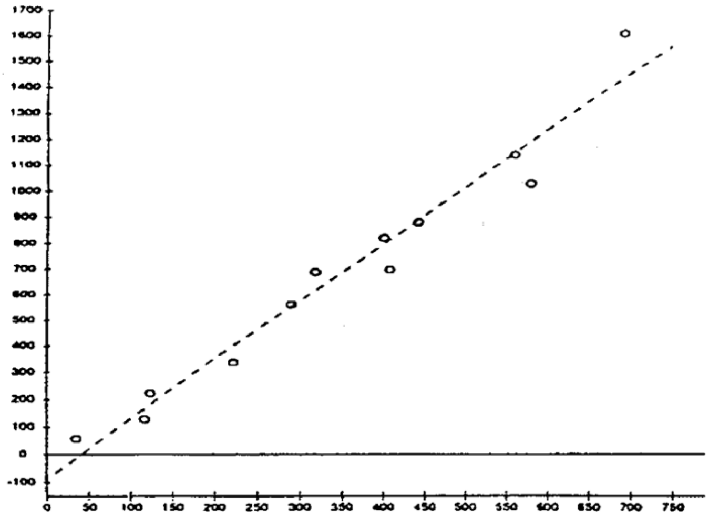
Elismert tény, hogy az algaalapú táp széntartalmát általában nem közvetlenül kell mérni, hanem olyan helyettesítő paraméterekkel rendelkező korrelációk (azaz nomogramok) alapján, mint pl. az algaszám vagy a fényelnyelés.

A TOC értékét az UV-sugárzásra alapozott vagy a perszulfátos módszerek helyett inkább magas hőmérsékletű oxidáció által célszerű mérni. (Útmutatásul lásd: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

A nomogram elkészítéséhez az algákat a tenyészközegtől centrifugálással el kell különíteni, amit desztillált vízben való reszuszpenzió követ. A helyettesítő paramétert és a TOC-koncentrációt minden mintában három példányban kell mérni. Kizárólag desztillált vizet tartalmazó vakmintákat kell elemezni, és a TOC-koncentrációt az algát tartalmazó minta TOC-koncentrációjából kell levonni.

A nomogram lineárisan fut a szénkoncentrációk megkövetelt tartományában. A példák alább találhatók.

Megjegyzés:
E példákat nem szabad konverzióra használni; alapvető fontosságú, hogy a laboratóriumok elkészítsék a saját nomogramjukat.



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

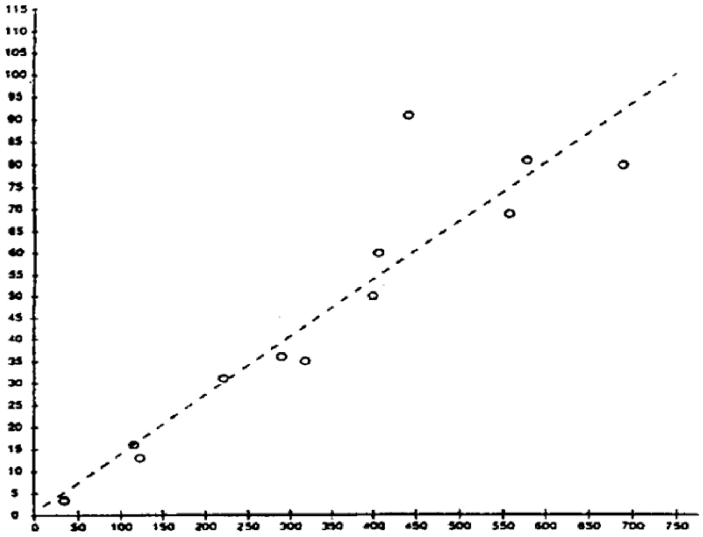
mg/l száraz tömeg regressziója mg C/l-re vetítve. Félfolyamatos batch tenyésztéssel tenyésztett sejtek desztillált vízben újraszuszpendált koncentrált szuszpenziójából nyert adatok.

x-tengely: a koncentrált algaalapú táplálék mg C/l-ben

y-tengely: a koncentrált algaalapú táp száraz tömege mg/l-ben

Korrekciós együttható – 0,980

▼**M7**



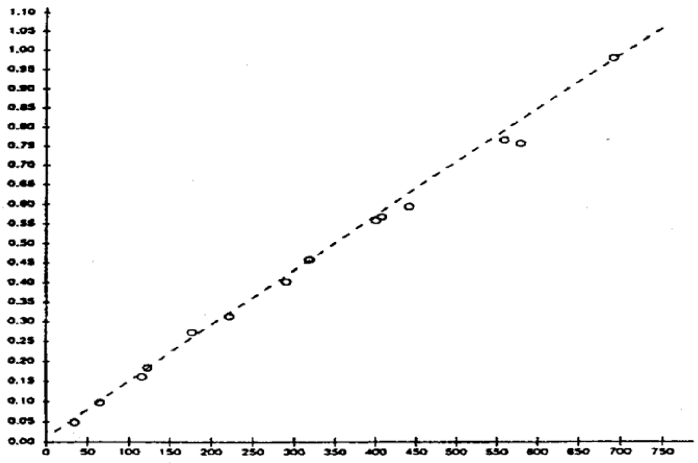
Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

A sejtszám regressziója mg C/l-re vetítve. Félfolyamatos batch tenyésztéssel tenyésztett sejtek desztillált vízben újraszuszpendált koncentrált szuszpenziójából nyert adatok.

x-tengely: a koncentrált algaalapú táplálék mg C/l-ben

y-tengely: a koncentrált algaalapú táplálék sejtszám/l-ben

Korrekciós együttható – 0,926



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Az elnyelés regressziója mg C/l-re vetítve (1 cm-es fényúttal). Félfolyamatos batch tenyésztéssel tenyésztett sejtek desztillált vízben újraszuszpendált koncentrált szuszpenziójából nyert adatok.

x-tengely: a koncentrált algaalapú táplálék mg C/l-ben

y-tengely: 1/10 hígítású koncentrált algaalapú táplálék abszorbanciája 440 nm-en

Korrekciós együttható – 0,998

▼M7

4. függelék

MINTAADATLAP A KÖZEGMEGÚJÍTÁS, FIZIKAI/KÉMIAI FIGYELEMMEL KÍSÉRÉS SORÁN KELETKEZETT ADATOK, ETETÉS, *DAPHNIA*-REPRODUKCIÓ ÉS SZÜLŐI MORTALITÁS RÖGZÍTÉSÉHEZ

Kísérlet sorszáma:	Kezdőnap:						Klón:			Közeg:				Táp típusa:				Vizsgálati vegyi anyag:					Névleges konc.:	
Nap	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Közegmegújítás (x-szel jelöljük)																								
pH (*)																							új	
																							régi	
O_2 (mg/l) (*)																							új	
																							régi	
Hőmérséklet (°C) (*)																							új	
																							régi	
Beadott táp (x-szel jelöljük)																								
Élő utódok száma (**)																								Összes
Edény 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

02008R0440 — HU — 16.10.2019 — 008.001 — 1825

▼M7

Kísérlet sorszáma:	Kezdőnap:						Klón:			Közeg:				Táp típusa:				Vizsgálati vegyi anyag:					Névleges konc.:	
Nap	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																								
																							Összes	
Kumulált szülői mortalitás (***)																								

(*) Tüntesse fel, hogy melyik edényt használta a kísérlethez
(**) AB-val jegyezze be a megfelelő rovatba az abortált ivadékokat
(***) M-mel jegyezze be a megfelelő rovatba a szülők elhullását

▼M7

5. függelék

MINTAADATLAP KÉMIAI ANALÍZISEK EREDMÉNYEINEK RÖGZÍTÉSÉHEZ

a) **Mért koncentrációk**

Névleges konc.	1. heti minta		2. heti minta		3. heti minta	
	friss	régi	friss	régi	friss	régi

b) **Mért koncentrációk a névleges koncentrációk százalékában**

Névleges konc.	1. heti minta		2. heti minta		3. heti minta	
	friss	régi	friss	régi	friss	régi

▼M7

6. függelék

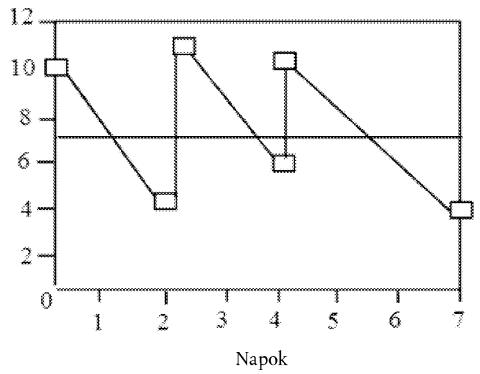
IDŐVEL SÚLYOZOTT ÁTLAG SZÁMÍTÁSA

Idővel súlyozott átlag

Mivel a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja a közeg megújításai közötti időintervallumban csökkenhet, szükséges mérlegelni, hogy melyik az a koncentráció, amelyet reprezentatívnak kell kiválasztani azon koncentrációtartomány meghatározása szempontjából, amelynek a *Daphnia* szülők ki vannak téve. A kiválasztást biológiai és statisztikai megfontolásokra kell alapozni. Például amennyiben úgy tűnik, hogy a reprodukciót főként az alkalmazásra kerülő legmagasabb koncentráció befolyásolja, akkor azt kell alkalmazni. Amennyiben azonban fontosabbnak látszik a toxikus vegyi anyag halmozott vagy hosszabb idő alatt jelentkező hatása, akkor egy átlagos koncentráció választása a célszerűbb. Ebben az esetben az idővel súlyozott átlagkoncentráció a megfelelő, mivel ez figyelembe veszi a pillanatnyi koncentrációnak az idő függvényében történő változásait.

1. ábra

Példa az idővel súlyozott átlagra



Az 1. ábra egy (egyszerűsített) hétnapos, a közeg megújítását a 0., 2. és 4. napra ütemező vizsgálatot mutat be.

— A vékony, cikcakkos vonal ábrázolja a koncentrációt az idő függvényében. A koncentráció visszaesése feltételezhetően egy exponenciális csökkenési folyamatot követ.

— A hat, kis négyzettel jelzett pont jelöli az egyes közegmegújítási időszakok elején és végén mért koncentrációkat.

— A vastag vonal jelzi az idővel súlyozott átlagot.

Az idővel súlyozott átlagot úgy kell kiszámítani, hogy az idővel súlyozott átlag nagysága megegyezzen a koncentrációgörbe alatti területtel. A fenti példa számítási menetét az 1. táblázat mutatja be.

1. táblázat

Az idővel súlyozott átlag számítása

Megújítás Szám	Napok	Konc. 0	Konc. 1	Ln(Konc. 0)	Ln(Konc. 1)	Terület
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

Megújítás Szám	Napok	Konc. 0	Konc. 1	Ln(Konc. 0)	Ln(Konc. 1)	Terület
Napok száma, összesen:	7				Összterület	50,092
					IS átlag	7,156

A *napok* kifejezés a megújítási folyamat napjainak a számát jelenti.

A *Konc. 0* kifejezés az egyes megújítási időszakok kezdetekor mért koncentráció.

A *Konc. 1* kifejezés az egyes megújítási időszakok végén mért koncentráció.

Az *Ln(Konc. 0)* kifejezés a Konc. 0 természetes alapú logaritmusa.

Az *Ln(Konc. 1)* kifejezés a Konc. 1 természetes alapú logaritmusa.

A *terület* az egyes megújítási időszakokra megszerkesztett exponenciális görbe alatti területet jelöli. A következő képlettel kell kiszámítani:

$$Terület = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times nap$$

Az idővel súlyozott átlag (*IS átlag*) a *Teljes terület* és az *Összes nap* hányadosa.

A *Daphnia* reprodukciós vizsgálat céljaira természetesen a táblázatot úgy kell kiterjeszteni, hogy az 21 napot fedjen le.

Egyértelmű, hogy ha csak a közeg egyes megújítási időszakainak az elején és végén végeznek megfigyeléseket, akkor nincs mód annak a megerősítésére, hogy a csökkenés valóban exponenciális. Egy másfajta görbe a *Terület*re nézve másfajta számítási eredményre vezetne. Az exponenciális csökkenési folyamat azonban valószínűsíthető, és egyéb információk hiányában valószínűleg a legjobb görbét adja.

Óvatosságra int azonban, ha a megújítási időszak végén a kémiai analízis nem mutat ki semmilyen vegyi anyagot. Ha nem lehet megbecsülni, hogy milyen gyorsan tűnt el a vizsgálati vegyi anyag az oldatból, akkor lehetetlen reálisan megítélni a görbe alatti terület nagyságát, és emiatt lehetetlen megállapítani egy ésszerű, idővel súlyozott átlagot.

▼M7

7. függelék

ÚTMUTATÁS AZ ÚJSZÜLÖTT IVARÁNAK MEGHATÁROZÁSÁHOZ

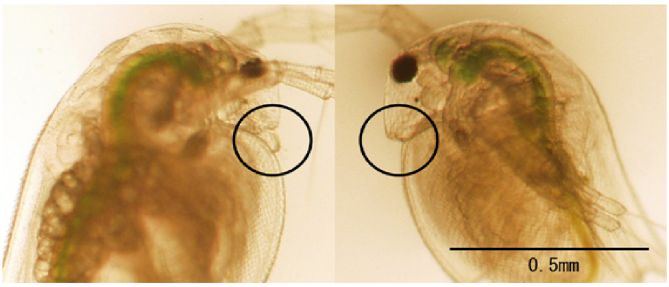
Megváltozott környezeti körülmények között, például lerövidített megvilágítási időszak, hőmérséklet, csökkenő tápkoncentráció és növekvő populációsűrűség előfordulhat hímivarú újszülött egyedek megjelenése (Hobaek and Larson, 1990; Kleiven *et al*., 1992). A hímivarú egyedek megjelenése emellett egyes rovarfejlődés-szabályozókra adott ismert válasz (Oda *et al*., 2005). Olyan körülmények között, amelyekben vegyi stresszforrások a partenogén nőstényektől származó reproduktív utódok csökkenéséhez vezetnek, várható a hímivarúegyedek nagyobb száma (OECD, 2008). A rendelkezésre álló információ alapján nem jelezhető előre, hogy az ivararány vagy a reprodukciós végpont lesz-e érzékenyebb, ugyanakkor vannak arra utaló jelek (referencia „validálási jelentés”, 1. rész), hogy a hímivarú egyedek számának e növekedése kevésbé érzékeny, mint a szaporulatban bekövetkező csökkenés. Ezért e vizsgálati módszer elsődleges célja annak felmérése, hogy mennyi utód születik, a hímivarú egyedek megjelenése opcionális megfigyelés tárgyát képezheti. Ha a tanulmány ezt az opcionális végpontot értékeli, egy további, a kontrollban legfeljebb 5 % hímivarú egyeddel kapcsolatos vizsgálati érvényességi kritériumot kell alkalmazni.

A *Daphnia* ivara megkülönböztetésének leginkább gyakorlatias és legkönnyebb módja a fenotípusos tulajdonságok alkalmazása, minthogy a hímek és a nőstények genetikailag azonosak, és ivarukat a környezet határozza meg. A hímek és nőstények első csápjának hossza és alakja eltérő, azaz a hímivarú egyedeké hosszabb, mint a nőstényeké (1. ábra). A különbség már közvetlenül a születést követően észlelhető, jóllehet másodlagos ivari jellegek is kifejlődnek a növekedéskor (lásd pl. a 2. ábrát, in: Olmstead és LeBlanc, 2000).

A morfológiai ivar megfigyelése érdekében az egyes vizsgálati állatok újszülöttjeit pipettával át kell helyezni vizsgálati közeget tartalmazó petricsészébe. A közegnek a lehető legkisebbnek kell lennie, hogy korlátozza az állatok mozgását. Az első csáp sztereomikroszkóppal (× 10–60) figyelhető meg.

1. ábra

A *D. magna* 24 órás hím (balra) és nőstény (jobbra) egyede. A hímek a nőstényektől az első csápjuk hossza és alakja alapján különböztethetők meg, amint az a bekarikázott részen látható (Tatarazako *et al*., 2004).



HIVATKOZÁSOK

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. TALAJLAKÓ MIKROORGANIZMUSOK: NITROGÉNÁTALAKÍTÁSI VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

Ez a vizsgálati módszer az OECD TG 216 (2000) módszer megfelelője.

1.1. BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egy olyan laboratóriumi módszert ismertet, amelynek célja annak vizsgálata, hogy az egyes vegyületek egyszeri expozíció esetén milyen hosszú távú hatásokat gyakorolnak a talajlakó mikroorganizmusok nitrogénátalakítási aktivitására. A vizsgálat elsősorban az Európai és Földközi-tenger Melléki Növényvédelmi Szervezet ajánlásain alapul (1). Azonban más iránymutatásokat, ezen belül a German Biologische Bundesanstalt (2), az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (3), a SETAC (4), valamint a Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (5) iránymutatásait is figyelembe vettünk. Az 1995-ben az olaszországi Belgiratéban megrendezett, a talajok/üledékek kiválasztásával kapcsolatos OECD-munkaértekezleten (6) megegyezés született az e vizsgálatban alkalmazandó talajok számáról és típusáról. A talajminták gyűjtéséről, kezeléséről és tárolásáról szóló ajánlások egy ISO-útmutatón (7) és a belgiratei munkaértekezlet ajánlásain alapulnak. A vizsgálandó anyagok toxikus jellemzőinek meghatározása és értékelése során szükség lehet a talaj mikrobiális aktivitására gyakorolt hatások meghatározására, például olyan esetben, ha adatokra van szükség a növényvédő szereknek a talaj mikroflórájára gyakorolt esetleges mellékhatásaival kapcsolatban, vagy ha a talajlakó mikroorganizmusoknak növényvédő szerektől eltérő vegyületekkel szembeni expozíciója várható. A nitrogénátalakítási vizsgálat végrehajtásának célja az ilyen vegyületeknek a talaj mikroflórájára gyakorolt hatásainak meghatározása. Amennyiben mezőgazdasági vegyi anyagok (pl. növényvédő szerek, műtrágyák, erdészeti vegyi anyagok) vizsgálatáról van szó, mind a nitrogénátalakítási, mind a szénátalakítási vizsgálatot el kell végezni. Ha nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata történik, elég a nitrogénátalakítási vizsgálatot elvégezni. Ha azonban a nitrogénátalakítási vizsgálat az ilyen vegyületek esetében olyan EC_{50}-értékeket eredményez, amelyek a kereskedelmi forgalomban kapható nitrifikációgátló szerek (pl. nitrapirin) esetében tapasztalt tartományba esik, további információk gyűjtése érdekében a szénátalakítási vizsgálatot is el lehet végezni.

A talajok élő és élettelen komponensekből épülnek fel, amelyek komplex és heterogén elegyek formájában léteznek. A mikroorganizmusok számos fajjal fontos szerepet játszanak a termőtalajok szervesanyag-tartalmának lebontásában és átalakításában, hozzájárulva a talajok termékenységének különféle aspektusaihoz. Az ilyen biokémiai folyamatokat megzavaró hosszú távú hatások potenciálisan megzavarhatják a tápanyag-körforgalmat, ami megváltoztathatja a talaj termékenységét. Szén- és nitrogénátalakítás minden termőtalajban folyik. Bár az e folyamatokért felelős mikrobaközösségek talajonként eltérőek, az átalakítási útvonalak lényegében azonosak.

Az ismertetett vizsgálati módszer célja valamely anyagnak az aerob feltalajokban zajló nitrogén-átalakítási folyamatra gyakorolt hosszú távú káros hatásainak kimutatása. A vizsgálati módszer lehetővé teszi az anyagnak a talaj mikrofl órája által végzett szénátalakítására gyakorolt hatásainak becslését. A nitrátképződés a szén-nitrogén kötések felbomlása után megy végbe. Ha tehát a kezelt és az ellenőrző talajmintákban azonos a nitrátképződés sebessége, nagyon valószínű, hogy a főbb szénlebontási útvonalak épek és működőképesek. A vizsgálathoz választott szubsztrátban (porított lucernaliszt) kedvező (általában 12:1 és 16:1 közötti) a szén-nitrogén arány. Emiatt a vizsgálat során csökken a széneh ezés, és ha a vegyi anyag károsítja a mikrobaközösségeket, azok 100 napon belül helyreállítódhatnak.

▼B

Azokat a teszteket, amelyekből ezt a vizsgálati módszert kifejlesztették, elsősorban olyan anyagokhoz dolgozták ki, amelyek esetében előre jelezhető a talajba kerülő mennyiség. Ez a helyzet például a növényvédő szerek esetében, amelyeknél ismert a szántóföldi alkalmazás mértéke. A mezőgazdasági vegyi anyagok esetében elegendő két, a várt vagy becsült alkalmazási mérték szempontjából releváns dózist alkalmazni. A mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálhatók aktív összetevőként (a.ö.) vagy formulázott termékként is. A vizsgálat azonban nem korlátozódik kizárólag a mezőgazdasági vegyi anyagokra. Mind a vizsgálandó anyagnak a talajban alkalmazott mennyiségét, mind az adatok kiértékelésének módját módosítva, a vizsgálat mezőgazdasági vegyi anyagoktól eltérő vegyületekre is alkalmazható, amelyek esetében nem ismert a talajba várhatóan bejutó mennyiség. A mezőgazdasági vegyi anyagoktól eltérő vegyületek esetében tehát egy sor koncentrációnál meg kell határozni a nitrogén-átalakításra gyakorolt hatásokat. Az ilyen vizsgálatokkal kapott adatok dózis-válasz görbék elkészítésére és EC_x-értékek számítására használhatók fel, ahol x jelentése % hatás.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

„Nitrogénátalakítás”: a nitrogéntartalmú szerves anyagok mikroorganizmusok által végzett, ammonifikáción és nitrifikáción keresztüli végső lebontása a megfelelő szervetlen végtermékké, nitráttá.

„EC_x (hatásos koncentráció)”: a vizsgálandó anyag olyan talajbeli koncentrációja, amely x %-osan gátoljaátolja a nitrogén nitráttá alakulását.

„EC_{50} (közepes hatásos koncentráció)”: a vizsgálandó anyag olyan talajbeli koncentrációja, amely 50 százalékosan (50 %-osan) gátolja a nitrogén nitráttá alakulását.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincs.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Átszitált talajt porított növényi liszttel fel kell javítani, majd vagy kezelni kell a vizsgálandó anyaggal, vagy kezeletlenül kell hagyni (kontroll). Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén minimálisan két vizsgálati koncentráció alkalmazása ajánlott, amelyeket a szántóföldeken várható legmagasabb koncentráció függvényében kell megválasztani. Az inkubálás 0., 7., 14. és 28. napja után a kezelt és ellenőrző talajmintákat megfelelő oldószerrel extrahálni kell, és meg kell határozni a kivonatokban lévő nitrát mennyiségét. Ezt követően történik a kezelt talajokban mért nitrátképződés arányának összehasonlítása a kontrollokban mérttel, valamint a kezelt és az ellenőrző talajminták közötti százalékos eltérés kiszámítása. Minden vizsgálatot legalább 28 napig kell végezni. Ha a 28. napon a kezelt és nem kezelt talajok közötti különbség 25 % vagy annál nagyobb, a méréseket legfeljebb 100 napig folytatni kell. Ha nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata történik, a vizsgálandó anyag egy sor különböző koncentrációjátoncentrációját kell a talajmintákhoz adni, és 28 napos inkubálás után meg kell mérni a kezelt és az ellenőrző mintákban képződött nitrát mennyiségét. A különféle koncentrációk alkalmazásával kapott vizsgálati eredményeket regressziós modell segítségével kell elemezni, majd ki kell számítani az EC_x-értékeket (azaz az EC_{50}-et, az EC_{25}-öt és/vagy az EC_{10}-et). Lásd a fogalommeghatározásokat.

1.5. A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

A mezőgazdasági vegyi anyagokkal kapott vizsgálati eredmények értékelése az ellenőrző és a kezelt talajminták nitráttartalma közötti viszonylag kis különbségeken (azaz az átlag ± 25 %-a) alapul, így az ellenőrző minták közötti nagy eltérések hamis eredményekhez vezethetnek. A párhuzamos ellenőrző minták közötti eltérésnek ±15 %-nál kisebbnek kell lennie.

▼B

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Eszközök**

Kémiailag inert anyagból készült vizsgálati edényeket kell használni. Ezeknek megfelelő, a talajok inkubálására alkalmazott eljárással, például az ömlesztve inkubálással vagy egyedi talajminták sorozataként történő inkubálásával összhangban lévő kapacitásúnak kell lenniük (lásd az 1.7.1.2. szakaszt). Ügyelni kell egyrészt a vízveszteség minimalizálására, másrészt a gázcsere lehetővé tételére a vizsgálat során (például a vizsgálati edények perforált polietilén fóliával fedhetők le). Illékony anyagok vizsgálata esetén zárható és légmentesen záródó edényeket kell alkalmazni. Az edényeknek olyan méretűnek kell lenniük, hogy a talajminta térfogatuk körülbelül egynegyedéig töltse fel őket.

Szabványos laboratóriumi eszközöket és ezen belül a következőket kell használni:

— keverőberendezés: mechanikai rázógép vagy ezzel egyenértékű más berendezés,

— centrifuga (3 000 g) vagy szűrőeszköz (nitrátmentes szűrőpapírral),

— a nitrátanalízishez megfelelő érzékenységet és reprodukálhatóságot biztosító műszer.

1.6.2. **A talajok kiválasztása és száma**

Csak egyféle talaj használható. A javasolt talajjellemzők a következők:

— homoktartalom: legalább 50 % és legfeljebb 75 %,

— pH: 5,5–7,5,

— szervesszén-tartalom: 0,5–1,5 %,

— meg kell mérni a mikrobiális biomasszát (8) (9), amelynek széntartalma a talaj teljes szervesszén-tartalmának legalább 1 %-a kell hogy legyen.

Az esetek többségében az ilyen jellemzőkkel rendelkező talaj a legrosszabb helyzetet reprezentálja, mivel minimális a vizsgálandó vegyület adszorpciója, viszont maximális a hozzáférhetősége a mikroflóra számára. Következésképpen általában nincs szükség más talajokkal végzett vizsgálatokra. Bizonyos körülmények között azonban, például amikor a vizsgálandó anyag várható fő felhasználási területe a különleges talajok, például a savanyú erdőtalajok vagy az elektrosztatikus töltéssel rendelkező vegyületek esetében is, szükség lehet egy másik talajtípus alkalmazására is.

▼B

1.6.3. **A talajminták begyűjtése és tárolása**

1.6.3.1. *Gyűjtés*

Részletes információkkal kell rendelkezni annak a szántóföldi területnek a történetéről, ahonnan a vizsgálati talajminta begyűjtése történik. Ilyen részletek például a pontos hely, a növénytakaró, a növényvédő szerekkel végzett kezelések időpontjai, a szerves és szervetlen trágyák alkalmazásai, a biológiai anyagok hozzáadása vagy a véletlen szennyezések. A talajminták gyűjtéshez olyan helyet kell választani, amely hosszú távon használható erre a célra. Megfelelőek például az állandó legelők, az évente gabonatermést (kivéve kukoricát) hozó területek vagy a zöldtrágyával sűrűn bevetett területek. Követelmény, hogy a kiválasztott mintagyűjtési helyet a mintagyűjtést megelőzően legalább egy évig ne kezeljék növényvédő szerekkel. Továbbá legalább hat hónapig ne kapjon szerves trágyázást. Ásványi műtrágya alkalmazása csak akkor elfogadható, ha a haszonnövény igényeinek megfelelően történik, és a műtrágyázást követően legalább három hónapig nem szabad talajmintákat venni. Kerülni kell az ismert biocid hatású műtrágyákkal (pl. kalcium-ciánamiddal) kezelt talajok alkalmazását.

Kerülni kell a mintavételt hosszú (30 napnál hosszabb) ideig tartó szárazság vagy elvizesedés esetén, illetve közvetlenül ilyen időszakok után. Szántott talajok esetében a mintákat 0–20 cm mélységből kell venni. Legelők vagy egyéb olyan talajok esetében, amelyeket hosszú ideig (legalább egy vegetációs periódusig) nem szántanak fel, a mintavétel maximális mélysége 20 cm-nél kicsit több (pl. 25 cm) is lehet.

A talajmintákat olyan edényekben és olyan hőmérsékleti feltételek mellett kell elszállítani, amelyek garantálják, hogy a talaj eredeti tulajdonságai nem módosulnak szignifikáns mértékben.

1.6.3.2. *Tárolás*

Legelőnyösebb a frissen gyűjtött talajok alkalmazása. Ha a laboratóriumi tárolás nem kerülhető el, a talajok sötétben, 4 ± 2 ^{o}C-on legfeljebb három hónapig tárolhatok. A talajok tárolása során aerob körülményeket kell biztosítani. Ha a talajminták begyűjtése olyan területeken történt, ahol a talaj az év legalább három hónapjában fagyott, szóba jöhet hat hónapos, mínusz 18 ^{o}C és mínusz 22 ^{o}C közötti hőmérsékleten való tárolás is. Minden egyes kísérlet előtt meg kell mérni a tárolt talajok mikrobiális biomasszáját, és a biomassza széntartalmának el kell érnie a talaj teljes szervesszén-tartalmának legalább 1 %-át (lásd az 1.6.2. szakaszt).

1.6.4. **A talaj kezelése és előkészítése a vizsgálatra**

1.6.4.1. *Előinkubálás*

Tárolt talaj használata esetén (lásd az 1.6.3.2. szakaszt) ajánlatos 2-től 28 napig terjedő előinkubálást alkalmazni. Az előinkubálás során a talaj hőmérsékletének és nedvességtartalmának hasonlónak kell lennie a vizsgálat során alkalmazott hőmérséklethez és nedvességtartalomhoz (lásd az 1.6.4.2. és az 1.7.1.3. szakaszt).

▼B

1.6.4.2. *Fizikai-kémiai tulajdonságok*

A talajból manuálisan el kell távolítani a nagyobb tárgyakat (például köveket, növényi részeket stb.), majd a túlzott kiszáradást kerülve a talajt nedvesen át kell szitálni úgy, hogy a részecskeméret legfeljebb 2 mm legyen. A talajminta nedvességtartalmát desztillált vagy ioncserélt vízzel a maximális víztartó képesség 40–60 %-ára kell beállítani.

1.6.4.3. *Szerves szubsztráttal történő javítás*

A talajt megfelelő szerves szubsztráttal, például 12:1 és 16:1 közötti C:N arányú, porított zöldlucernafű-liszttel (fő összetevő: *Medicago sativa*) fel kell javítani. A javasolt lucerna-talaj arány 5 g lucerna per 1 kilogramm talaj (szárazsúly).

1.6.5. **A vizsgálandó anyag előkészítése a talajon történő alkalmazáshoz**

A vizsgálandó anyagot általában hordozó segítségével kell alkalmazni. A hordozó lehet víz (vízben oldható anyagok esetében) vagy valamely inert szilárd anyag, így például finom kvarchomok (részecskeméret: 0,1–0,5 mm). Kerülni kell a víztől eltérő folyékony hordozók (például szerves oldószerek, így például aceton, kloroform) alkalmazását, mivel ezek károsíthatják a mikroflórát. Ha hordozóként homokot használunk, a homok be is vonható a megfelelő oldószerben feloldott vagy szuszpendált vizsgálandó anyaggal. Ilyen esetekben az oldószert a talajba való bekeverés előtt el kell párologtatni. Ahhoz, hogy a vizsgálandó anyag optimális módon oszoljon szét a talajban, a következő arány ajánlott: 10 g homok per 1 kilogramm talaj (szárazsúly). Az ellenőrző mintákat ugyanilyen mennyiségű vízzel és/vagy kvarchomokkal kell kezelni.

Illékony vegyületek vizsgálata esetén, amennyire lehet, kerülni kell a kezelés közbeni veszteséget, valamint a vegyület talajban való homogén eloszlásának biztosítására is törekedni kell (például a vizsgálandó anyagot több helyen is be kell injektálni a talajba).

1.6.6. **Vizsgálati koncentrációk**

Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén legalább két koncentrációt kell alkalmazni. Az alacsonyabb koncentrációnak legalább a gyakorlatban a talajba várhatóan bejutó legnagyobb mennyiségnek kell megfelelnie, a magasabb koncentrációnak pedig az alacsonyabb koncentráció valamely többszörösének kell lennie. A talajhoz adott vizsgálandó anyag koncentrációját 5 cm-es mélységig egyenletes beépülést és 1,5 g/cm^3-es talaj térfogatsűrűséget feltételezve kell kiszámolni. A közvetlenül a talajra kihordott mezőgazdasági vegyi anyagok vagy az olyan vegyületek esetében, amelyeknek a talajba bejutó mennyisége előre jelezhető, az ajánlott vizsgálati koncentrációk a következők: a maximális becsült környezeti koncentráció (PEC) és ennek ötszöröse. Azoknak az anyagoknak az esetében, amelyeket egy idényben várhatóan több alkalommal is kihordanak a talajokra, a vizsgálathoz alkalmazandó koncentráció a PEC-értéknek a kihordások maximálisan várható számával történő megszorzásával számítható ki. A vizsgált magasabb koncentrációnak azonban nem szabad meghaladnia az egyszeri maximális alkalmazási arány tízszeresét. Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén legalább öt, mértani sort alkotó koncentrációt kell alkalmazni. A vizsgált koncentrációknak le kell fedniük az EC_x-értékek meghatározásához szükséges tartományt.

▼B

1.7. A VIZSGÁLAT VÉGREHAJTÁSA

1.7.1. **Az expozíció körülményei**

1.7.1.1. *Kezelés és kontroll*

Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a talajt három, egyenlő tömegű részre kell osztani. Két részlethez a terméket is tartalmazó hordozót kell keverni, a harmadikhoz pedig csak hordozót (kontroll). Ajánlatos a kezelt és nem kezelt talajokat is legalább három másolati mintában vizsgálni. Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a talajt hat, egyenlő tömegű részletre kell osztani. Öthöz a vizsgálandó anyagot is tartalmazó hordozót kell keverni, a hatodikhoz pedig csak hordozót. A kezeléseket és az ellenőrző kísérleteket is ajánlatos legalább három másolati mintában végezni. Vigyázni kell arra, hogy az anyag homogén módon legyen eloszlatva a kezelt talajmintákban. A bekeverés során el kell kerülni a talaj tömörödését vagy összecsomósodását.

1.7.1.2. *A talajminták inkubálása*

A talajminták inkubálása kétféle módon történhet: az egyes kezelt és nem kezelt talajokból vagy ömlesztett mintákat kell készíteni, vagy egy sor önálló és egyforma méretű részmintát. Illékony vegyületek vizsgálata esetén azonban a vizsgálatot csak egy önálló részmintákból álló sorozattal kell elvégezni. A talajok ömlesztve történő inkubálása esetén minden kezelt és nem kezelt talajt nagy mennyiségben kell elkészíteni, és a vizsgálat során szükség szerint ezekből kell részmintákat venni a különféle analízisekhez. Az, hogy kiindulásképpen milyen mennyiséget kell készíteni az egyes kezelésekhez és ellenőrző vizsgálatokhoz, függ a részminták méretétől, az analízishez használt másolati minták számától, valamint a mintavételek várható maximális számától. A részminták vétele előtt az ömlesztve inkubált talajokat alaposan össze kell keverni. Ha a talajok inkubálása önálló részminták sorozataként történik, az egyes kezelt és nem kezelt ömlesztett talajmintákat a szükséges számú részmintára kell felosztani, amelyeket azután igény szerint kell felhasználni. Olyan kísérleteknél, amikor várhatóan több mint két alkalommal kell majd mintát venni, elegendő számú részmintát kell készíteni ahhoz, hogy azokból minden másolati mintára és mintavételi alkalomra jusson. A teszttalajokat legalább három másolati mintában kell aerob körülmények között inkubálni (lásd az 1.7.1.1. szakaszt). Minden egyes vizsgálat során megfelelő gőztérrel rendelkező edényeket kell használni annak érdekében, hogy ne alakuljanak ki anaerob körülmények. Illékony anyagok vizsgálata esetén a vizsgálatot csak egy önálló részmintákból álló sorozattal kell elvégezni.

1.7.1.3. *A kísérlet körülményei és időtartama*

A vizsgálatot sötétben, 20 ± 2 °C-os szobahőmérsékleten kell elvégezni. A talajmintákat a vizsgálat időtartama alatt a talaj maximális víztartó kapacitásának 40 és 60 százaléka közötti értéken kell tartani (lásd az 1.6.4.2. szakaszt) ± 5 %-os eltéréssel. Szükség esetén desztillált vagy ioncserélt víz adható a mintákhoz.

A vizsgálat minimális időtartama 28 nap. Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén össze kell hasonlítani a kezelt és az ellenőrző mintákban mért nitrátképződési sebességet. Ha a 28. napon ezek több mint 25 %-kal eltérnek egymástól, a vizsgálatot addig kell folytatni, amíg a különbség 25 %-ra vagy az alá nem csökken, vagy legfeljebb 100 napig, ha az a korábbi időpont. A nem mezőgazdasági vegyi anyagok esetében a vizsgálat a 28 nap után véget ér. A 28. napon meg kell határozni a kezelt és az ellenőrző talajminták nitráttartalmát, és ki kell számítani az EC_x-értékeket.

▼B

1.7.2. **Mintavétel és a talajok elemzése**

1.7.2.1. *Talajminta-vételi program*

Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a 0., 7., 14. és 28. napon meg kell mérni a talajminták nitráttartalmát. Ha hosszabb időtartamú vizsgálatot kell végezni, a nitráttartalommméréseket a 28. nap után 14 naponta kell végezni.

Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén legalább öt vizsgálati koncentrációt kell alkalmazni, és a talajminták nitráttartalmát az expozíciós időszak kezdetén (0. nap) és végén (28. nap) kell megmérni. Szükség esetén be lehet iktatni egy köztes mérést is, például a 7. napon. A 28. napon kapott adatok segítségével meg kell határozni a vegyület EC_x-értékeit. Szükség esetén a talaj kiindulási nitráttartalmának megadására a 0. napon az ellenőrző mintákban mért adatokat lehet felhasználni.

1.7.2.2. *A talajminták analízise*

Minden mintavételi időpontban meg kell határozni az egyes kezelt és ellenőrző másolati mintákban keletkezett nitrát mennyiségét. A nitrát kinyerése a talajból úgy történik, hogy a mintákat egy extrakciós oldószerrel, például 0,1 M kálium-klorid oldattal rázatni kell. A javasolt arány 5 ml KCl-oldat 1 gramm talaj szárazsúly-egyenértékre. Az extrahálás optimalizálásra érdekében a talajmintát és az extrakciós oldatot tartalmazó edények legfeljebb félig lehetnek. Az elegyeket 60 percig 150 rpm fordulatszámon kell rázatni. Ezt követően az elegyeket centrifugálni vagy szűrni kell, és a folyadékfázisban kell meghatározni a nitrát mennyiségét. A részecskementes folyékony kivonatok az analízist megelőzően mínusz 20 ± 5 °C-on legfeljebb hat hónapig tárolhatók.

2. **ADATOK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálat esetén le kell jegyezni az egyes másolati talajmintákban képződött nitrát mennyiségét, és a másolati minták átlagát táblázatos formában kell megadni. A nitrogénátalakítási arányokat megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszerekkel (például F-teszt, 5 %-os szignifikanciaszint) kell kiértékelni. A képződött nitrát mennyiségét mg nitrát/kg talaj (szárazsúly)/nap egységekben kell kifejezni. Az egyes kezeléseknél mért nitrátképződési sebességeket össze kell hasonlítani az ellenőrző mintában mérttel, és ki kell számítani az ellenőrző mintától való százalékos eltérést.

Nem mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálat esetén meg kell határozni az egyes másolati mintákban képződött nitrát mennyiségét, és dózis-válasz görbét kell felvenni az EC_x-értékek becsléséhez. A kezelt minták 28 nap után mért nitráttartalmát (mg nitrát/kg talaj (szárazsúly)) össze kell hasonlítani az ellenőrző mintákban mérttel. Ezekből az adatokból ki kell számítani az egyes vizsgálati koncentrációkra vonatkozó %-os gátlási értékeket. A százalékos értékeket a koncentráció függvényében kell ábrázolni, majd statisztikai eljárások alkalmazásával ki kell számítani az EC_x-értékeket. A számított EC_x-értékek konfidenciahatárát ($p = 0,95$) is a szabványos eljárások segítségével kell meghatározni (10) (11) (12).

A nagy mennyiségű nitrogént tartalmazó vizsgálandó anyagok növelhetik a vizsgálat során képződött nitrát mennyiségét. Ha magas koncentrációban történik az ilyen anyagok (azaz olyan vegyi anyagok, amelyek várhatóan ismételt kihordással kerülnek felhasználásra) vizsgálata, gondoskodni kell a megfelelő ellenőrző mintákról (talaj plusz vizsgálandó anyag, növényi liszt hozzáadása nélkül). Az ilyen ellenőrző mintákból származó adatokat is figyelembe kell venni az EC_x-értékek számításakor.

▼B

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

Ha a mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálatok eredményeinek értékelésekor az alacsonyabb koncentrációjú kezeléssel (azaz a maximális becsült koncentrációval) és az ellenőrző mintákkal kapott nitrátképződési arányok különbsége a 28. nap utáni mintavételi időpontok valamelyikénél nem haladja meg a 25 %-ot, azt a következtetést kell levonni, hogy a terméknek nincs hosszú távú hatása a talajokban zajló nitrogénátalakításra. A nem mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálatok esetében a vegyületek értékeléséhez az EC_{50}-, EC_{25}- és/vagy EC_{10}-értékeket kell használni.

3. **JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

a talaj teljes körű azonosítása, ezen belül:

— a terület földrajzi meghatározása (földrajzi hosszúság és szélesség),

— a terület történetével kapcsolatos információk (növénytakaró, növényvédő szerekkel való kezelés, műtrágyázás, véletlen szennyezések stb.),

— földhasználat (például mezőgazdasági talaj, erdő stb.),

— a mintavétel mélysége (cm),

— homok-/iszap-/agyagtartalom (% szárazsúly),

— pH (vízben),

— szervesszén-tartalom (% szárazsúly),

— nitrogéntartalom (% szárazsúly),

— kiindulási nitrátkoncentráció (mg nitrát/kg szárazsúly),

— kationcserélő kapacitás (mmol/kg),

— mikrobiális biomassza a teljes szervesszén-tartalom százalékában kifejezve,

— hivatkozások az egyes paraméterek meghatározásához alkalmazott módszerekre,

— a talajminták gyűjtésével és tárolásával kapcsolatos minden információ,

— adott esetben a talaj előinkubálásával kapcsolatos részletek.

Vizsgálandó anyag:

— fizikai jelleg és adott esetben fizikai-kémiai tulajdonságok,

— — kémiai azonosító adatok, és ezen belül adott esetben a szerkezeti képlet, tisztaság (növényvédő szerek esetében az aktív összetevő százalékos aránya), nitrogéntartalom.

Szubsztrát:

— a szubsztrát származása,

— összetétel (lucernaliszt, zöldlucernafű-liszt),

— szén- és nitrogéntartalom (% szárazsúly),

— szitaméret (mm).

▼B

Vizsgálati körülmények:

— a talaj szerves szubsztráttal való javításának részletei,

— a vizsgálandó vegyi anyag alkalmazott koncentrációinak száma és adott esetben a koncentrációk megválasztásának indoklása,

— a vizsgálandó anyag talaj on való alkalmazásának részletei,

— inkubálási hőmérséklet,

— a talaj nedvességtartalma a vizsgálat kezdetén és a vizsgálat alatt,

— az alkalmazott talajinkubálási módszer (ömlesztett minták vagy önálló részminták sorozata),

— másolati minták száma,

— mintavételi időpontok,

— a talaj nitráttartalmának extrahálására alkalmazott módszer.

Eredmények:

— a nitrátmeghatározáshoz alkalmazott analitikai eljárás és berendezés,

— táblázatos formában megadott adatok, ezen belül a nitrátmérések egyedi és átlagértékei,

— a másolati minták közötti eltérések a kezelt és ellenőrző mintákban,

— adott esetben a számításoknál alkalmazott korrekciók magyarázata,

— az egyes mintavételi időpontokban mért nitrátképződési sebességek százalékos eltérése vagy adott esetben a 95 százalékos konfidenciahatárral meghatározott EC_{50}-érték, a többi EC_x-érték (az EC_{25} vagy az EC_{10}) konfidenciaintervallumokkal, és a dózis-válasz görbe grafikonja,

— az eredmények statisztikai kezelése,

— az eredmények értelmezését segítő minden információ és megfigyelés.

4. **SZAKIRODALOM**

(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) SET AC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SET AC-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. (Talajminőség – Mintavétel – A mikrobiális folyamatok laboratóriumi értékelésére szolgáló talaj begyűjtésére, kezelésére és tárolására vonatkozó iránymutatás.)

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate- induced respiration method. (Talajminőség. A talaj mikrobiális biomasszájának meghatározása. 1. rész: Szubsztrátindukált respirációs módszer.)

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation- extraction method. (Talajminőség. A talaj mikrobiális biomasszájának meghatározása. 2. rész: Gőzextrakciós módszer.)

(10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Then, 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. TALAJLAKÓ MIKROORGANIZMUSOK: SZÉNÁTALAKÍTÁSI VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

Ez a módszer az OECD TG 217 (2000) módszer megfelelője.

1.1. BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egy olyan laboratóriumi módszert ismertet, amelynek célja annak vizsgálata, hogy a növényvédő szerek és esetleg más vegyi anyagok egyszeri expozíció esetén milyen potenciális hosszú távú hatásokat gyakorolnak a talajlakó mikroorganizmusok szénátalakítási aktivitására. A vizsgálat elsősorban az Európai és Földközi-tenger Melléki Növényvédelmi Szervezet ajánlásain alapul (1). Azonban más iránymutatásokat, ezen belül a German Biologische Bundesanstalt (2), az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (3) és a SET AC (4) iránymutatásait is figyelembe vettünk. Az 1995-ben az olaszországi Belgirateban megrendezett, a talajok/üledékek kiválasztásával kapcsolatos OECD-munkaértekezleten (5) megegyezés született az e vizsgálatban alkalmazandó talajok számáról és típusáról. A talajminták gyűjtéséről, kezeléséről és tárolásáról szóló ajánlások egy ISO-útmutatón (6) és a belgiratei munkaértekezlet ajánlásain alapulnak.

A vizsgálandó anyagok toxikus jellemzőinek meghatározása és értékelése során szükség lehet a talaj mikrobiális aktivitására gyakorolt hatások meghatározására, például olyan esetben, ha adatokra van szükség a növényvédő szereknek a talaj mikroflórájára gyakorolt esetleges mellékhatásaival kapcsolatban, vagy ha a talaj lakó mikroorganizmusoknak növényvédő szerektől eltérő vegyületekkel szembeni expozíciója várható. A szénátalakítási vizsgálat végrehajtásának célja az ilyen vegyületeknek a talaj mikroflórájára gyakorolt hatásainak meghatározása. Amennyiben mezőgazdasági vegyi anyagok (pl. növényvédő szerek, műtrágyák, erdészeti vegyi anyagok) vizsgálatáról van szó, mind a szénátalakítási, mind a nitrogénátalakítási vizsgálatot el kell végezni. Ha nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata történik, elég a nitrogénátalakítási vizsgálatot elvégezni. Ha azonban a nitrogénátalakítási vizsgálat az ilyen vegyületek esetében olyan EC_{50}-értékeket eredményez, amelyek a kereskedelmi forgalomban kapható nitrifikációgátló szerek (pl. nitrapirin) esetében tapasztalt tartományba esik, további információk gyűjtése érdekében a szénátalakítási vizsgálatot is el lehet végezni.

A talajok élő és élettelen komponensekből épülnek fel, amelyek komplex és heterogén elegyek formájában léteznek. A mikroorganizmusok számos fajjal fontos szerepet játszanak a termőtalajok szervesanyag-tartalmának lebontásában és átalakításában, hozzájárulva a talajok termékenységének különféle aspektusaihoz. Az ilyen biokémiai folyamatokat megzavaró hosszú távú hatások potenciálisan megzavarhatják a tápanyag-körforgalmat, ami megváltoztathatja a talaj termékenységét. Szén- és nitrogénátalakítás minden termőtalajban folyik. Bár az e folyamatokért felelős mikrobaközösségek talajonként eltérőek, az átalakítási útvonalak lényegében azonosak.

▼B

Ennek a vizsgálati módszernek a célja valamely anyagnak az aerob feltalajokban zajló szénátalakítási folyamatra gyakorolt hosszú távú káros hatásainak kimutatása. A vizsgálati módszer érzékeny a szénátalakításért felelős mikrobaközösségek méretében és aktivitásában bekövetkező változásokra, mivel ez kémiai stresszt és szénéhezést okoz ezekben a közösségekben. A vizsgálathoz alacsony szervesanyag-tartalmú homokos talajt kell használni. Ezt a talajt kezelni kell a vizsgálandó anyaggal, majd gyors mikrobiális anyagcserét biztosító körülmények között inkubálni kell. Ilyen körülmények között hamar kimerülnek a talaj könnyen hozzáférhető szénforrásai. Ez szénéhezést okoz, ami elpusztítja a mikrobákat és egyben nyugalmi állapotot és/vagy spóraképzést idéz elő. Ha a vizsgálat több mint 28 napig tart, e reakciók összessége a kontroll- (kezeletlen) talajokban a metabolikusan aktív mikrobiális biomassza progresszív elvesztéseként mérhető (7). Ha valamely vegyi anyag jelenléte a vizsgálat körülményei között befolyást gyakorol a szénstresszelt talajban található biomasszára, akkor a biomassza nem tud visszatérni ugyanarra a szintre, mint a kontrolltalajokban. A vizsgálandó anyag által a vizsgálat során bármikor előidézett zavaró hatás tehát gyakran egészen a vizsgálat végéig fennmarad.

Azokat a teszteket, amelyekből ezt a vizsgálati módszert kifejlesztették, elsősorban olyan anyagokhoz dolgozták ki, amelyek esetében előre jelezhető a talajba kerülő mennyiség. Ez a helyzet például a növényvédő szerek esetében, amelyeknél ismert a szántóföldi alkalmazás mértéke. A mezőgazdasági vegyi anyagok esetében elegendő két, a várt vagy becsült alkalmazási mérték szempontjából releváns dózist alkalmazni. A mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálhatók aktív összetevőként (a.ö.) vagy formulázott termékként is. A vizsgálat azonban nem korlátozódik kizárólag a megbecsülhető környezeti koncentrációval rendelkező anyagokra. Mind a vizsgálandó anyagnak a talajban alkalmazott mennyiségét, mind az adatok kiértékelésének módját módosítva, a vizsgálat mezőgazdasági vegyi anyagoktól eltérő vegyületekre is alkalmazható, amelyek esetében nem ismert a talajba várhatóan bejutó mennyiség. A nem mezőgazdasági vegyi anyagok esetében tehát egy sor koncentrációnál meg kell határozni a szénátalakításra gyakorolt hatásokat. Az ilyen vizsgálatokkal kapott adatok dózis-válasz görbék elkészítésére és EC_x-értékek számítására használhatók fel, ahol x jelentése % hatás.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

„Szénátalakítás”: szerves anyagok mikroorganizmusok által végzett lebontása a megfelelő szervetlen végtermékké, azaz szén-dioxiddá.

„EC_x (hatásos koncentráció)”: a vizsgálandó anyag olyan talajbeli koncentrációja, amely x %-osan gátolja a szén szén-dioxiddá alakulását.

„EC_{50} (közepes hatásos koncentráció)”: a vizsgálandó anyag olyan talajbeli koncentrációja, amely 50 százalékosan (50 %-osan) gátolja a szén szén-dioxiddá alakulását.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincs.

▼B

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az átszitált talajt a vizsgálandó anyaggal kell kezelni, vagy kezeletlenül kell hagyni (kontroll). Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén minimálisan két vizsgálati koncentráció alkalmazása ajánlott, amelyeket a szántóföldeken várható legmagasabb koncentráció függvényében kell megválasztani. Az inkubálás 0., 7., 14. és 28. napja után a kezelt és az ellenőrző talajmintákhoz glükózt kell keverni, majd 12 órán át folyamatosan mérni kell a glükózindukált légzési sebességet. A légzési sebességet a felszabaduló szén-dioxidban (mg szén-dioxid/kg száraz talaj/óra) vagy az elfogyasztott oxigénben (mg oxigén/kg talaj/óra) kell kifejezni. A kezelt talajokban mért közepes légzési rátát össze kell hasonlítani az ellenőrző minta esetében mérttel, majd ki kell számítani a kezelt és az ellenőrző talajminták közötti százalékos eltérést. Minden vizsgálatot legalább 28 napig kell végezni. Ha a 28. napon a kezelt és nem kezelt talajok közötti különbség 25 % vagy annál nagyobb, a méréseket 14 napos intervallumokban, legfeljebb 100 napos időtartamig folytatni kell. Ha nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata történik, a vizsgálandó anyag egy sor különböző koncentrációját kell a talajmintákhoz adni, és 28 nap után meg kell mérni a kezelt és az ellenőrző mintákban a glükózindukált légzési sebességeket (azaz a képződő szén-dioxid vagy az elfogyasztott oxigén átlagos mennyiségét). A különböző koncentrációk alkalmazásával kapott vizsgálati eredményeket regressziós modell segítségével kell elemezni, majd ki kell számítani az EC_x-értékeket (azaz az EC_{50}-et, az EC_{25}-öt és/vagy az EC_{10}-et). Lásd a fogalommeghatározásokat.

1.5. A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

A mezőgazdasági vegyi anyagokkal kapott vizsgálati eredmények értékelése az ellenőrző és a kezelt talajmintákban felszabaduló szén-dioxid vagy elfogyasztott oxigén közötti viszonylag kis különbségeken (azaz az átlag ± 25 %-a) alapul, így az ellenőrző minták közötti nagy eltérések hamis eredményekhez vezethetnek. A párhuzamos ellenőrző minták közötti eltérésnek ±15 %-nál kisebbnek kell lennie.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Eszközök**

Kémiailag inert anyagból készült vizsgálati edényeket kell használni. Ezeknek megfelelő, a talajok inkubálására alkalmazott eljárással, például az ömlesztve inkubálással vagy egyedi talajminták sorozataként történő inkubálással megfelelő összhangban lévő kapacitásúnak kell lenniük (lásd az 1.7.1.2. szakaszt). Ügyelni kell egyrészről a vízveszteség minimalizálására, másrészről a gázcsere lehetővé tételére a vizsgálat során (például a vizsgálati edények perforált polietilén fóliával fedhetők le). Illékony anyagok vizsgálata esetén zárható és légmentesen záródó edényeket kell alkalmazni. Az edényeknek olyan méretűnek kell lenniük, hogy a talajminta-térfogatuk körülbelül egynegyedéig töltse fel őket.

A glükózindukált légzés meghatározásához inkubálórendszerekre és a szén-dioxid-termelés vagy az oxigénfogyasztás mérésére alkalmas műszerekre van szükség. Ilyen rendszerekre és műszerekre példák a (8), (9), (10) és (11) hivatkozásban találhatók.

1.6.2. **A talajok kiválasztása és száma**

Csak egyféle talaj használható. A javasolt talajjellemzők a következők:

— homoktartalom: legalább 50 % és legfeljebb 75 %,

▼B

— pH: 5,5–7,5,

— szervesszén-tartalom: 0,5–1,5 %,

— meg kell mérni a mikrobiális biomasszát (12) (13), amelynek széntartalma a talaj teljes szervesszén-tartalmának legalább 1 %-a kell hogy legyen.

Az esetek többségében az ilyen jellemzőkkel rendelkező talaj a legrosszabb helyzetet reprezentálja, mivel minimális a vizsgálandó vegyület adszorpciója, viszont maximális a hozzáférhetősége a mikroflóra számára. Következésképpen általában nincs szükség más talajokkal végzett vizsgálatokra. Bizonyos körülmények között azonban, például amikor a vizsgálandó anyag várható fő felhasználási területe a különleges talajok, például a savanyú erdőtalajok vagy az elektrosztatikus töltéssel rendelkező vegyületek esetében is, szükség lehet ennek egy másik talajtípussal való helyettesítésre.

1.6.3. **A talajminták begyűjtése és tárolása**

1.6.3.1. *Gyűjtés*

Részletes információkkal kell rendelkezni annak a szántóföldi területnek a történetéről, ahonnan a vizsgálati talajminta begyűjtése történik. Ilyen részletek például a pontos hely, a növénytakaró, a növényvédő szerekkel végzett kezelések időpontjai, a szerves és szervetlen trágyák alkalmazásai, a biológiai anyagok hozzáadása vagy a véletlen szennyezések. A talajminták gyűjtéshez olyan helyet kell választani, amely hosszú távon használható erre a célra. Megfelelőek például az állandó legelők, az évente gabonatermést (kivéve kukoricát) hozó területek vagy a zöldtrágyával sűrűn bevetett területek. Követelmény, hogy a kiválasztott mintagyűjtési helyet a mintagyűjtést megelőzően legalább egy évig ne kezeljék növényvédő szerekkel. Továbbá legalább hat hónapig ne kapjon szerves trágyázást. Ásványi műtrágya alkalmazása csak akkor elfogadható, ha a haszonnövény igényeinek megfelelően történik, és a műtrágyázást követően legalább három hónapig nem szabad talajmintákat venni. Kerülni kell az ismert biocid hatású műtrágyákkal (pl. kalcium-ciánamiddal) kezelt talajok alkalmazását.

Kerülni kell a mintavételt hosszú (30 napnál hosszabb) ideig tartó szárazság vagy elvizesedés esetén, illetve közvetlenül ilyen időszakok után. Szántott talajok esetében a mintákat 0–20 cm mélységből kell venni. Legelők vagy egyéb olyan talajok esetében, amelyeket hosszú ideig (legalább egy vegetációs periódusig) nem szántanak fel, a mintavétel maximális mélysége 20 cm-nél kicsit több (pl. 25 cm) is lehet. A talajmintákat olyan edényekben és olyan hőmérsékleti feltételek mellett kell elszállítani, amelyek garantálják, hogy a talaj eredeti tulajdonságai nem módosulnak szignifikáns mértékben.

1.6.3.2. *Tárolás*

Legelőnyösebb a frissen gyűjtött talajok alkalmazása. Ha a laboratóriumi tárolás nem kerülhető el, a talajok sötétben, 4 ± 2 °C-on legfeljebb három hónapig tárolhatók. A talajok tárolása során aerob körülményeket kell biztosítani. Ha a talajminták begyűjtése olyan területeken történt, ahol a talaj az év legalább három hónapjában fagyott, szóba jöhet hat hónapos, mínusz 18 °C hőmérsékleten való tárolás is. Minden egyes kísérlet előtt meg kell mérni a tárolt talajok mikrobiális biomasszáját, és a biomassza széntartalmának el kell érnie a talaj teljes szervesszén-tartalmának legalább 1 %-át (lásd az 1.6.2. szakaszt).

▼B

1.6.4. **A talaj kezelése és előkészítése a vizsgálatra**

1.6.4.1. *Előinkubálás*

Tárolt talaj használata esetén (lásd az 1.6.4.2. és az 1.7.1.3. szakaszt) ajánlatos 2-től 28 napig terjedő előinkubálást alkalmazni. Az előinkubálás során a talaj hőmérsékletének és nedvességtartalmának hasonlónak kell lennie a vizsgálat során alkalmazott hőmérséklethez és nedvességtartalomhoz (lásd az 1.6.4.2. és az 1.7.1.3. szakaszt).

1.6.4.2. *Fizikai-kémiai tulajdonságok*

A talajból manuálisan el kell távolítani a nagyobb tárgyakat (például köveket, növényi részeket stb.), majd a túlzott kiszáradást kerülve a talajt nedvesen át kell szitálni úgy, hogy a részecskeméret legfeljebb 2 mm legyen. A talajminta nedvességtartalmát desztillált vagy ioncserélt vízzel a maximális víztartó képesség 40–60 %-ára kell beállítani.

1.6.5. **A vizsgálandó anyag előkészítése a talajon történő alkalmazáshoz**

A vizsgálandó anyagot általában hordozó segítségével kell alkalmazni. A hordozó lehet víz (vízben oldható anyagok esetében) vagy valamely inert szilárd anyag, így például finom kvarchomok (részecskeméret: 0,1–0,5 mm). Kerülni kell a víztől eltérő folyékony hordozók (például szerves oldószerek, így például aceton, kloroform) alkalmazását, mivel ezek károsíthatják a mikroflórát. Ha hordozóként homokot használunk, a homok be is vonható a megfelelő oldószerben feloldott vagy szuszpendált vizsgálandó anyaggal. Ilyen esetekben az oldószert a talajba való bekeverés előtt el kell párologtatni. Ahhoz, hogy a vizsgálandó anyag optimális módon oszoljon szét a talajban, a következő arány ajánlott: 10 g homok per 1 kilogramm talaj (szárazsúly). Az ellenőrző mintákat ugyanilyen mennyiségű vízzel és/vagy kvarchomokkal kell kezelni.

Illékony vegyületek vizsgálata esetén kerülni kell a kezelés közbeni veszteséget, valamint a vegyület talajban való homogén eloszlásának biztosítására is törekedni kell (például a vizsgálandó anyagot több helyen is be kell injektálni a talajba).

1.6.6. **Vizsgálati koncentrációk**

Növényvédő szerek és egyéb, megbecsülhető környezeti koncentrációval rendelkező vegyületek vizsgálata esetén legalább két koncentrációt kell alkalmazni. Az alacsonyabb koncentrációnak legalább a gyakorlatban a talajba várhatóan bejutó legnagyobb mennyiségnek kell megfelelnie, a magasabb koncentrációnak pedig az alacsonyabb koncentráció valamely többszörösének kell lennie. A talajhoz adott vizsgálandó anyag koncentrációját 5 cm-es mélységig egyenletes beépülést és 1,5 g/cm^3-es talaj térfogatsűrűséget feltételezve kell kiszámolni. A közvetlenül a talajra kihordott mezőgazdasági vegyi anyagok vagy az olyan vegyületek esetében, amelyeknek a talajba bejutó mennyisége előre jelezhető, az ajánlott vizsgálati koncentrációk a következők: a megbecsülhető környezeti koncentráció (PEC) és ennek ötszöröse. Azoknak az anyagoknak az esetében, amelyeket egy idényben várhatóan több alkalommal is kihordanak a talajokra, a vizsgálathoz alkalmazandó koncentráció a PEC-értéknek a kihordások maximálisan várható számával történő megszorzásával számítható ki. A vizsgált magasabb koncentrációnak azonban nem szabad meghaladnia az egyszeri maximális alkalmazási arány tízszeresét.

Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén legalább öt, mértani sort alkotó koncentrációt kell alkalmazni. A vizsgált koncentrációknak le kell fedniük az EC_x-értékek meghatározásához szükséges tartományt.

▼B

1.7. A VIZSGÁLAT VÉGREHAJTÁSA

1.7.1. **Az expozíció körülményei**

1.7.1.1. *Kezelés és kontroll*

Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a talajt három, egyenlő tömegű részre kell osztani. Két részlethez a terméket is tartalmazó hordozót kell keverni, a harmadikhoz pedig csak hordozót (kontroll). Ajánlatos a kezelt és nem kezelt talajokat is legalább három másolati mintában vizsgálni. Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a talajt hat, egyenlő tömegű részletre kell osztani. Öthöz a vizsgálandó anyagot is tartalmazó hordozót kell keverni, a hatodikhoz pedig csak hordozót. A kezeléseket és az ellenőrző kísérleteket is ajánlatos legalább három másolati mintában végezni. Vigyázni kell arra, hogy az anyag homogén módon legyen eloszlatva a kezelt talajmintákban. A bekeverés során el kell kerülni a talaj tömörödését vagy összecsomósodását.

1.7.1.2. *A talajminták inkubálása*

A talajminták inkubálása kétféle módon történhet: az egyes kezelt és nem kezelt talajokból vagy ömlesztett mintákat kell készíteni, vagy egy sor önálló és egyforma méretű részmintát. Illékony vegyületek vizsgálata esetén azonban a vizsgálatot csak egy önálló részmintákból álló sorozattal kell elvégezni. A talajok ömlesztve történő inkubálása esetén minden kezelt és nem kezelt talajt nagy mennyiségben kell elkészíteni, és a vizsgálat során szükség szerint ezekből kell részmintákat venni a különféle analízisekhez. Az, hogy kiindulásképpen milyen mennyiséget kell készíteni az egyes kezelésekhez és ellenőrző vizsgálatokhoz, függ a részminták méretétől, az analízishez használt másolati minták számától, valamint a mintavételek várható maximális számától. A részminták vétele előtt az ömlesztve inkubált talajokat alaposan össze kell keverni. Ha a talajok inkubálása önálló részminták sorozataként történik, az egyes kezelt és nem kezelt ömlesztett talajmintákat a szükséges számú részmintára kell felosztani, amelyeket azután igény szerint kell felhasználni. Olyan kísérleteknél, amikor várhatóan több mint két alkalommal kell majd mintát venni, elegendő számú részmintát kell készíteni ahhoz, hogy azokból minden másolati mintára és mintavételi alkalomra jusson. A teszttalajokat legalább három másolati mintában kell aerob körülmények között inkubálni (lásd az 1.7.1.1. szakaszt). Minden egyes vizsgálat során megfelelő gőztérrel rendelkező edényeket kell használni annak érdekében, hogy ne alakuljanak ki anaerob körülmények. Illékony anyagok vizsgálata esetén a vizsgálatot csak egy önálló részmintákból álló sorozattal kell elvégezni.

1.7.1.3. *A kísérlet körülményei és időtartama*

A vizsgálatot sötétben, 20 ± 2 °C-os szobahőmérsékleten kell elvégezni. A talajmintákat a vizsgálat időtartama alatt a talaj maximális víztartó kapacitásának 40 és 60 százaléka közötti értéken kell tartani (lásd az 1.6.4.2. szakaszt) ± 5 %-os eltéréssel. Szükség esetén desztillált vagy ioncserélt víz adható a mintákhoz.

A vizsgálat minimális időtartama 28 nap. Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén össze kell hasonlítani a kezelt és az ellenőrző mintákban felszabaduló szén-dioxid vagy elfogyasztott oxigén mennyiségét. Ha a 28. napon ezek több mint 25 %-kal eltérnek egymástól, a vizsgálatot addig kell folytatni, amíg a különbség 25 %-ra vagy az alá nem csökken, vagy legfeljebb 100 napig, ha az a korábbi időpont. Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a vizsgálat a 28. nap után véget ér. A 28. napon meg kell határozni a kezelt és az ellenőrző talajmintákban felszabaduló szén-dioxid vagy elfogyasztott oxigén mennyiségét, és ki kell számítani az EC_x-értékeket.

▼B

1.7.2. **Mintavétel és a talajok elemzése**

1.7.2.1. *Talajminta-vételi program*

Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a 0., 7., 14. és 28. napon meg kell mérni a talajmintákban a glükózindukált légzési sebességeket. Ha hosszabb időtartamú vizsgálatot kell végezni, a további méréseket a 28. nap után 14 naponta kell végezni.

Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén legalább öt vizsgálati koncentrációt kell alkalmazni, és a talajminták glükózindukált légzését az expozíciós időszak kezdetén (0. nap) és végén (28. nap) kell megmérni. Szükség esetén be lehet iktatni egy köztes mérést is, például a 7. napon. A 28. napon kapott adatokból meg kell határozni a vegyi anyag EC_x-értékét. Szükség esetén a 0. napon az ellenőrző mintákban mért adatok segítségével meg lehet becsülni, hogy a talajban eredetileg milyen mennyiségben volt jelen metabolikusan aktív mikrobiális biomassza (12).

1.7.2.2. *A glükózindukált légzési sebesség mérése*

Minden mintavételi időpontban meg kell határozni az egyes kezelt és ellenőrző másolati mintákban tapasztalható glükózindukált légzési sebességet. A talajmintákhoz olyan mennyiségű glükózt kell keverni, hogy az azonnali maximális légzési választ váltson ki. Az adott talajban a maximális válasz kiváltásához szükséges glükózmennyiséget előzetes vizsgálatokkal lehet meghatározni, amelyhez egy sor különböző glükózkoncentrációt kell alkalmazni (14). A 0,5–1,5 % szerves szént tartalmazó homokos talajok esetében azonban általában elegendő, ha 2 000 - 2 000 mg/kg talaj (szárazsúly) mennyiségben adunk hozzá glükózt. A glükóz tiszta kvarchomokkal (10 g homok/kg talaj (szárazsúly)) porrá őrölhető és homogén módon a talajhoz keverhető.

A glükózzal feljavított talajmintákat a légzési sebességet folyamatosan, óránként vagy kétóránként mérő, megfelelő berendezésben (lásd az 1.6.1. szakaszt), 20 ± 2 °C-on inkubálni kell. A felszabaduló szén-dioxidot vagy elfogyasztott oxigént 12 órán át folyamatosan mérni kell, és a mérést a lehető leghamarabb, azaz a glükóz hozzáadása után 1-2 órán belül el kell kezdeni. Meg kell mérni a 12 óra alatt felszabaduló szén-dioxid vagy elfogyasztott oxigén teljes mennyiségét, és ebből meg kell határozni a közepes légzési sebességeket.

2. **ADATOK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálat esetén le kell jegyezni az egyes másolati talajmintákban felszabaduló szén-dioxid vagy elfogyasztott oxigén mennyiségét, és a másolati minták átlagát táblázatos formában kell megadni. Az eredményeket megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszerekkel (például F-teszt, 5 %-os szignifikanciaszint) kell kiértékelni. A glükózindukált légzési sebességet szén-dioxid/kg talaj (szárazsúly)/óra vagy mg oxigén/talaj (szárazsúly)/óra egységekben kell kifejezni. Az egyes kezeléseknél mért közepes szén-dioxid képződési vagy közepes oxigénfogyasztási sebességeket össze kell hasonlítani az ellenőrző mintában mérttel, és ki kell számítani az ellenőrző mintától való százalékos eltérést.

▼B

Nem mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálat esetén meg kell határozni az egyes másolati mintákban a felszabaduló szén-dioxid vagy az elfogyasztott oxigén mennyiségét, és dózis-válasz görbét kell felvenni az EC_x-értékek becsléséhez. A kezelt mintákban 28 nap után mért glükózindukált légzési sebességeket (mg szén-dioxid/kg talaj (szárazsúly)/óra vagy mg oxigén/talaj (szárazsúly)/óra) össze kell hasonlítani az ellenőrző mintákban mérttel. Ezekből az adatokból ki kell számítani az egyes vizsgálati koncentrációkra vonatkozó %-os gátlási értékeket. A százalékos értékeket a koncentráció függvényében kell ábrázolni, majd statisztikai eljárások alkalmazásával ki kell számítani az EC_x-értékeket. A számított EC_x-értékek konfidencia-határát ($p = 0,95$) is a szabványos eljárások segítségével kell meghatározni (15) (16) (17).

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

Ha a mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálatok eredményeinek értékelésekor az alacsonyabb koncentrációjú kezeléssel (azaz a maximális becsült koncentrációval) és az ellenőrző mintákkal kapott légzési sebességek különbsége a 28. nap utáni mintavételi időpontok valamelyikénél nem haladja meg a 25 %-ot, akkor azt a következtetést kell levonni, hogy a terméknek nincs hosszú távú hatása a talajokban folyó szénátalakításra. A nem mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálatok esetében a vegyületek értékeléséhez az EC_{50}-, EC_{25}- és/vagy EC_{10}-értékeket kell használni.

3. **JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

a talaj teljes körű azonosítása, ezen belül:

— a terület földrajzi meghatározása (földrajzi hosszúság és szélesség),

— a terület történetével kapcsolatos információk (növénytakaró, növényvédő szerekkel való kezelés, műtrágyázás, véletlen szennyezések stb.),

— földhasználat (például mezőgazdasági talaj, erdő stb.),

— a mintavétel mélysége (cm),

— homok-/iszap-/agyagtartalom (% szárazsúly),

— pH (vízben),

— szervesszén-tartalom (% szárazsúly),

— nitrogéntartalom (% szárazsúly),

— kationcserélő kapacitás (mmol/kg),

— kiindulási mikrobiális biomassza a teljes szervesszén-tartalom százalékában kifejezve,

— hivatkozások az egyes paraméterek meghatározásához alkalmazott módszerekre,

— a talajminták gyűjtésével és tárolásával kapcsolatos minden információ,

— adott esetben a talaj előinkubálásával kapcsolatos részletek.

▼B

Vizsgálandó anyag:

— fizikai jelleg és adott esetben fizikai-kémiai tulajdonságok,

— kémiai azonosító adatok és ezen belül adott esetben a szerkezeti képlet, tisztaság (növényvédő szerek esetében az aktív összetevő százalékos aránya), nitrogéntartalom.

Vizsgálati körülmények:

— a talaj szerves szubsztráttal való javításának részletei,

— a vizsgálandó vegyi anyag alkalmazott koncentrációinak száma és adott esetben a koncentrációk megválasztásának indoklása,

— a vizsgálandó anyag talaj on való alkalmazásának részletei,

— inkubálási hőmérséklet,

— a talaj nedvességtartalma a vizsgálat kezdetén és a vizsgálat alatt,

— az alkalmazott talaj inkubálási módszer (ömlesztett minták vagy önálló részminták sorozata),

— másolati minták száma,

— mintavételi időpontok.

Eredmények:

— a légzési sebesség mérésére alkalmazott módszer és berendezés,

— táblázatos formában megadott adatok, ezen belül a szén-dioxid vagy oxigén mennyiségek egyedi és átlagértékei,

— a másolati minták közötti eltérések a kezelt és ellenőrző mintákban,

— adott esetben a számításoknál alkalmazott korrekciók magyarázata,

— az egyes mintavételi időpontokban mért glükózindukált légzési sebességek százalékos eltérése, vagy adott esetben a 95 százalékos konfidenciahatárral meghatározott EC_{50}-érték, a többi EC_x-érték (azaz az EC_{25} vagy az EC_{10}) konfidencia-intervallumokkal és a dózis-válasz görbe grafikonja,

— adott esetben az eredmények statisztikai kezelése,

— az eredmények értelmezését segítő minden információ és megfigyelés.

4. **SZAKIRODALOM**

(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) SET AC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SET AC-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. (Talajminőség – Mintavétel – A mikrobiális folyamatok laboratóriumi értékelésére szolgáló talaj begyűjtésére, kezelésére és tárolására vonatkozó iránymutatás.)

(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. (Talajminőség. Útmutató a talajban levő szerves vegyi anyagok aerob feltételek melletti biológiai lebonthatóságának laboratóriumi vizsgálatára.)

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions. (Talajminőség. Laboratóriumi inkubációs rendszerek a talajban lévő szerves vegyi anyagok aerob feltételek mellett végbemenő mineralizációjának vizsgálatához.)

(11) Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate- induced respiration method. (Talajminőség. A talaj mikrobiális biomasszájának meghatározása. 1. rész: Szubsztrátindukált respirációs módszer.)

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method. (Talajminőség. A talaj mikrobiális biomasszájának meghatározása. 2. rész: Gőzextrakciós módszer.)

(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 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. **AEROB ÉS ANAEROB ÁTALAKÍTÁS A TALAJBAN**

1. **MÓDSZER**

Ez a vizsgálati módszer az OECD TG 307 (2002) módszer megfelelője.

1.1. BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer meglévő iránymutatásokon alapul (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Az ennél a vizsgálati módszernél ismertetett módszer célja a vegyi anyagok talajban zajló aerob és anaerob átalakításának értékelése. A kísérletek során meghatározható i. a vizsgálandó anyag átalakulási sebessége; valamint ii. azon átalakulási termékek jellege, illetve keletkezésének és eltűnésének sebessége, amelyekkel a növények és talajlakó szervezetek kapcsolatba kerülhetnek. Az ilyen vizsgálatokra olyan vegyi anyagok esetében van szükség, amelyeket közvetlenül a talajokra hordanak ki, vagy amelyek valószínűleg bekerülnek a talaj környezetbe. Az ilyen laboratóriumi vizsgálatok eredményei a kapcsolódó szántóföldi vizsgálatok mintavételi és elemzési protokolljainak kidolgozásához is felhasználhatók.

Az egy talajtípussal végzett aerob és anaerob vizsgálatok általában elegendőek az átalakítási útvonalak értékeléséhez (8) (10) (11). Az átalakulási sebességeket legalább három további talajban meg kell határozni (8) (10).

Az 1995-ben az olaszországi Belgirateban megrendezett, a talajok/üledékek kiválasztásával kapcsolatos OECD-munkaértekezleten (10) megegyezés született az e vizsgálatban alkalmazandó talajok számáról és típusáról. A vizsgált talajtípusoknak reprezentatívnak kell lenniük azon környezeti feltételek vonatkozásában, ahol a használat vagy kibocsátás történik. Azokat a vegyi anyagokat például, amelyek kibocsátása a szubtrópusi-trópusi éghajlaton történhet, Ferrasol vagy Nitosol (FAO-rendszer) talajokkal kell vizsgálni. A munkaértekezleten az ISO-útmutató (15) alapján ajánlásokat fogalmaztak meg a talajminták gyűjtésével, kezelésével és tárolásával kapcsolatosan is. Ennél a módszernél esik szó a rizstalajok alkalmazásáról is.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

„Vizsgálandó anyag”: bármely anyag, legyen az a kiindulási vegyület, vagy megfelelő átalakulási termék.

„Átalakulási termékek”: minden olyan anyag, amely a vizsgálandó anyag biotikus vagy abiotikus átalakulási reakciói nyomán keletkezik, beleértve a CO_2-t, illetve a megkötött maradványokban lévő összes termék.

„Megkötött maradványok”: A „megkötött maradványok” a talajban, növényekben vagy állatokban jelen lévő olyan vegyületek, amelyek a kiindulási vegyület vagy annak anyagcsereterméke(i)/átalakulási termékei formájában extrahálás után is a mátrixban maradnak. Az extrakciós módszer alapjában véve nem változtathatja meg magukat a vegyületeket vagy a mátrix szerkezetét. A kötés jellege részben mátrixmódosító extrakciós módszerek, valamint kifinomult analitikai technikák segítségével tisztázható. Ez idáig kovalens, ionos és szorpciós kötéseket, valamint bezáródásokat azonosítottak ilyen módon. A megkötött maradványok létrejötte általánosságban szignifikánsan csökkenti a biológiai elérhetőséget és biológiai hozzáférhetőséget (12) (az IUPAC 1984-ben módosította (13)).

„Aerob átalakulás”: molekuláris oxigén jelenlétében végbemenő reakciók (14).

▼B

„Anaerob átalakulás”: molekuláris oxigén kizárásával végbemenő reakciók (14).

„Talaj”: ásványi és szerves kémiai komponensek keveréke, amelyek közül az utóbbiak magas szén- és nitrogéntartalmú, valamint nagy molekulasúlyú vegyületek, amelyeket apró élő szervezetek (főleg mikroorganizmusok) népesítenek be. A talajok kétféle állapotban kezelhetők:

a) érintetlen talajok, különféle talajtípusok jellegzetes rétegződésével, ahogy azok a múltban kialakultak;

b) megbolygatott talajok, például ahogy általában szántóföldeken találhatók, vagy amikor ásással mintákat vesznek belőlük és e vizsgálati módszer céljára azokat felhasználják (14).

„Mineralizáció”: a szerves vegyületek teljes mértékű lebomlása aerob körülmények között CO_2-vé és H_20-vá, illetve anaerob körülmények között CH_4-gyé, CO_2-vé és H_20-vá. E vizsgálati módszer vonatkozásában a ^{14}C-jelölt vegyületek alkalmazásakor a mineralizáció kiterjedt lebomlást jelent, amelynek során egy jelölt szénatom oxidálódik, és megfelelő mennyiségű $^{14}CO_2$ szabadul fel (14).

„Felezési idő”: t0,5, a vizsgálandó anyag 50 %-ának átalakulásához szükséges idő, ha az átalakulás elsőrendű kinetikával leírható; a felezési idő független a koncentrációtól.

„**DT_{50} (lebomlási idő 50)”:** az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag koncentrációja 50 %-kal csökken; akkor nem azonos a felezési idővel (t0,5), ha az átalakulás nem elsőrendű kinetikát követ.

„DT_{75} (lebomlási idő 75)”: az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag koncentrációja 75 %-kal csökken.

„**DT_{90} (lebomlási idő 90)”:** az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag koncentrációja 90 %-kal csökken.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Az átalakulási termékek spektroszkópiás és kromatográfiás módszerekkel történő jellemzéséhez és/vagy azonosításához referenciaanyagokat kell alkalmazni.

1.4. A VIZSGÁLAT ALKALMAZHATÓSÁGA

A módszer minden vegyi anyaghoz alkalmazható (legyen az nem jelölt vagy jelölt anyag), amelyhez létezik kielégítően pontos és érzékeny analitikai módszer. Enyhén illékony, nem illékony, vízben oldható és vízben nem oldható vegyületekhez is alkalmazható. A vizsgálat nem alkalmazható olyan vegyi anyagokra, amelyek a talajban nagymértékben illékonyak (például gáz alakú növényvédő szerek, szerves oldószerek), és ezért nem lehet őket a vizsgálat kísérleti körülményei között a talajban tartani.

▼B

1.5. A VIZSGÁLANDÓ ANYAGGAL KAPCSOLATOS INFORMÁCIÓK

Az átalakulás sebességének mérésére nem jelölt vagy jelölt vizsgálandó anyag is alkalmazható. Jelölt anyagra olyankor van szükség, ha az átalakulás útvonalait kívánjuk tanulmányozni vagy anyagmérleget kívánunk felállítani. A ^{14}C-jelölés az ajánlott, de más izotópok, így például C, N, H vagy P is alkalmazható. Amennyire csak lehetséges, a jelölést a molekula legstabilabb részén vagy részein kell elhelyezni ([1]). A vizsgálandó anyagnak legalább 95 %-os tisztaságúnak kell lennie.

A talajban zajló aerob és anaerob átalakulás vizsgálatának elvégzése előtt a vizsgálandó anyaggal kapcsolatban az alábbi információkkal kell rendelkezni:

a) oldhatóság vízben (A6. módszer);

b) oldhatóság szerves oldószerekben;

c) gőznyomás (A4. módszer) és Henry-törvény állandó;

d) n-oktanol/víz megoszlási hányados (A8. módszer);

e) kémiai stabilitás sötétben (hidrolízis) (C7. módszer);

f) pKa, ha valamelyik molekula hajlamos a protonálódásra vagy deprotonálódásra (112. számú OECD-iránymutatás) (16).

További hasznos információk lehetnek a vizsgálandó anyagnak a talaj lakó mikroorganizmusokra gyakorolt toxicitásával kapcsolatos adatok (C.21. és C.22. vizsgálati módszer) (16).

A vizsgálandó anyagok és átalakulási termékeik mennyiségi és minőségi meghatározására szolgáló analitikai módszereknek (köztük az extrakciós és gázlekötő módszereknek) rendelkezésre kell állniuk.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Talajmintákat a vizsgálandó anyaggal kell kezelni, és ellenőrzött laboratóriumi körülmények között (állandó hőmérséklet és talajnedvesség) sötétben, biométer-típusú lombikban vagy átfolyásos rendszerekben inkubálni kell őket. Megfelelő időközönként talajmintákat kell venni, amelyekben extrahálás után meg kell határozni a vizsgálandó anyagot, illetve az átalakulási termékeket. Megfelelő adszorpciós eszközök segítségével illékony termékek is gyűjthetők elemzés céljára. ^{14}C-jelölt anyagok alkalmazásával, a fejlődő $^{14}CO_2$ befogása után megmérhetők a vizsgálandó anyag különféle mineralizációs sebességei, és megállapítható az anyagmérleg, ezen belül a lekötött maradványok képződése is.

1.7. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

1.7.1. **Visszanyerés**

A vizsgálandó anyag hozzáadása után azonnal legalább két másolati talajmintát elemezve megkaphatók az analitikai módszer ismételhetőségével és a vizsgálandó anyag alkalmazására szolgáló eljárás egységességével kapcsolatos első információk. A kísérletek későbbi szakaszában a visszanyeréseket a vonatkozó anyagmérlegek adják. A visszanyeréseknek jelölt vegyületek esetében 90 % és 110 % között (8), nem jelölt vegyületek esetében pedig 70 % és 110 % között (3) kell mozogniuk.

([1]) Ha a vizsgálandó anyag például egy gyűrűt tartalmaz, akkor ezt a gyűrűt kell megjelölni; ha a vizsgálandó anyag két vagy több gyűrűt is tartalmaz, külön vizsgálatokra lehet szükség az egyes jelölt gyűrűk sorsának megismeréséhez, illetve az átalakulási termékek keletkezésével kapcsolatos információk összegyűjtéséhez.

▼B

1.7.2. **Az analitikai módszer megismételhetősége és érzékenysége**

A vizsgálandó anyag és átalakulási termékei mennyiségi meghatározása vonatkozásában (a kiindulási extrakciós hatékonyság kivételével) az analitikai módszer megismételhetősége az átalakulási termékek megjelenéséhez elegendő ideig történő inkubálás után ugyanannak a talaj kivonatnak két másolati mintában történő mérésével ellenőrizhető.

Az adott vizsgálandó anyagra és átalakulási termékeire az analitikai módszer kimutathatósági határértékének (LOD) legalább 0,01 $mg.kg^{-1}$ talaj (mint vizsgálandó anyag), vagy – ha az a kisebb – az alkalmazott dózis 1 %-ának kell lennie. Meg kell határozni továbbá a mennyiségi meghatározás határértékét (LOQ) is.

1.7.3. **Az átalakulási adatok pontossága**

Ha a vizsgálandó anyag koncentrációját az idő függvényében regressziós analízisnek vetik alá, akkor megfelelő információk nyerhetők az átalakulási görbe megbízhatóságáról, és lehetővé válik a konfidenciahatárok kiszámítása a felezési időkhöz (pszeudo-elsőrendű kinetika esetén) vagy a DT_{50}-értékekhez, illetve adott esetben a DT_{75}- és DT_{90}-értékekhez is.

1.8. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.8.1. **Berendezés és reagensek**

Az inkubálórendszerek statikus, zárt rendszerekből vagy megfelelő átfolyásos rendszerekből állnak (7) (17). Megfelelő átfolyásos talajinkubáló berendezésekre és biométer-típusú lombikokra az 1., illetve 2. ábrán láthatók példák. Mindkét inkubálórendszernek megvannak az előnyei és korlátai (7) (17).

Szabványos laboratóriumi eszközökre van szükség, különösen a következőkre:

— analitikai műszerek, például GLC-, HPLC-, TLCLC-berendezés, ezen belül a radioaktívan jelölt vagy nem jelölt anyagok analízisére vagy a fordított izotóphígítási módszerhez alkalmazható megfelelő detektáló rendszerek,

— minőségi meghatározásra alkalmazható műszerek (például MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR stb.),

— folyadékszcintillációs számláló,

— oxidálószer a radioaktív anyagok elégetéséhez,

— centrifuga,

— extrakciós készülék (például centrifugacsövek hideg extraháláshoz és Soxhlet-készülék reflux alatt végzett folytonos extraháláshoz),

— oldatok és kivonatok töményítésére szolgáló berendezések (pl. rotációs evaporátor),

— vízfürdő,

— mechanikai keverőeszközök (pl. dagasztógép, rotációs keverő).

▼B

Az alkalmazott kémiai reagensek például az alábbiak:

— NaOH, analitikai minőségű, 2 mol dm^{-3}, vagy más megfelelő bázis (pl. KOH, etanolamin),

— H_2SO_4, analitikai minőségű, 0,05 mol. dm^{-3},

— etilén-glikol, analitikai minőségű,

— szilárd adszorpciós anyagok, például nátronmész, és poliuretán dugók,

— szerves oldószerek, analitikai minőségű, például aceton, metanol stb.,

— szcintillációs folyadék.

1.8.2. **A vizsgálandó anyag alkalmazása**

A vizsgálandó anyag talajhoz adásához és abban történő eloszlatásához azt először fel kell oldani (ioncserélt vagy desztillált) vízben vagy ha szükséges, minimális mennyiségű acetonban vagy más szerves oldószerben (6), amelyben a vizsgálandó anyag kellően oldható és stabil. A kiválasztott oldószer mennyisége azonban nem gyakorolhat szignifikáns hatásokat a talaj mikrobiális aktivitására (lásd az 1.5. és az 1.9.2–1.9.3. szakaszt). Kerülni kell az olyan oldószerek, például a kloroform, a diklór-metán és egyéb halogénezett oldószerek alkalmazását, amelyek gátolják a mikrobiális aktivitást.

A vizsgálandó anyag szilárd formában, például kvarchomokkal keverve (6) vagy elég száraz és sterilezett, kis térfogatú teszttalajrészmintában is a talajhoz adható. Ha a vizsgálandó anyagot oldószer alkalmazásával adjuk a talajhoz, az oldószernek el kell párolognia a vizsgálandó anyaggal kezelt részminta eredeti, nem steril talajmintához történő hozzáadása előtt.

Általános vegyi anyagok esetében, amelyeknél a talajba való bejutás fő útvonala a szennyvíziszap vagy a mezőgazdasági tevékenységek, a vizsgálandó anyagot először iszaphoz kell keverni, és ebben a formában kell a talajmintába juttatni (lásd az 1.9.2. és az 1.9.3. szakaszt).

A formulázott termékek alkalmazása általában nem ajánlott. A rosszul oldódó vizsgálandó anyagok esetében azonban megfelelő alternatíva lehet a formulázott anyag alkalmazása.

1.8.3. **Talajok**

1.8.3.1. *A talaj kiválasztása*

Az átalakulási útvonal meghatározásához reprezentatív talajok alkalmazhatók, így például ajánlott az olyan homokos vályog vagy iszapos vályog vagy vályog, vagy a vályogos homok (a FAO és az USDA osztályozása szerint (18)), amelynek pH-ja 5,5 és 8,0 közötti, szervesszén-tartalma 0,5–2,5 %, mikrobiális biomasszája pedig legalább a teljes szervesszéntartalom 1 %-ának megfelelő (10).

Az átalakulási sebesség vizsgálatokhoz legalább három további olyan talajt kell alkalmazni, amelyek jól reprezentálnak egy sor megfelelő talajtípust. A különféle talajokban eltérőnek kell lenniük a szervesszén-tartalom, a pH, az agyagtartalom és a mikrobiális biomassza értékeinek.

▼B

A talajokat legalább a szerkezet (%homok, %iszap, %agyag) (a FAO és az USDA osztályozása szerint (18)), a pH, a kationcserélő kapacitás, a szerves szén, a térfogatsűrűség, a vízvisszatartási jellemzők ([1]) 1 és mikrobiális biomassza (csak az aerob vizsgálatokhoz) szempontjából jellemezni kell. Az eredmények értelmezéséhez hasznosak lehetnek a talajok tulajdonságaival kapcsolatos további információk is. A talajok jellemzőinek meghatározására a (19), (20), (21), (22) és (23) hivatkozásban ajánlott módszerek alkalmazhatók. A mikrobiális biomasszát a szubsztrátindukált légzési (SIR) módszerrel (25) (26) vagy alternatív módszerekkel (20) kell meghatározni.

1.8.3.2. *A talajok gyűjtése, kezelése és tárolása*

Részletes információkkal kell rendelkezni annak a szántóföldi területnek a történetéről, ahonnan a vizsgálati talajminta begyűjtése történik. Ilyen részletek például a pontos hely, a növénytakaró, a növényvédő szerekkel végzett kezelések, a szerves és szervetlen trágyákkal végzett kezelések, a biológiai anyagok hozzáadása vagy egyéb szennyezések. Nem alkalmazhatók átalakulási vizsgálatokhoz olyan talajok, amelyeket az elmúlt négy évben a vizsgálandó anyaggal vagy szerkezeti analógjaival kezeltek (10) (15).

A talajt frissen kell begyűjteni a területről (az A-rétegből vagy a felső 20 cm-es rétegből) a benne lévő talajnedvességgel együtt, amely megkönnyíti a szitálást. A rizsföldekről származó talajok kivételével kerülni kell a mintavételt a hosszabb (> 30 napos) szárazságok, fagyok vagy áradások idején vagy közvetlenül ezek után (14). A mintákat úgy kell szállítani, hogy közben minimális legyen a talaj víztartalmának változása, és – lehetőség szerint – sötétben kell tartani, illetve biztosítani kell a szabad levegőbeáramlást. Erre a célra általában megfelel egy lazán összekötött polietilén zsák.

A talajt a mintavételt követően a lehető leggyorsabban fel kell dolgozni. El kell távolítani belőle a növényi részeket, a nagyobb méretű talajfaunát és a köveket, majd 2 mm-es szitán át kell szitálni, ami eltávolítja a kisebb köveket, az állati és növényi törmeléket is. A szitálás előtt meg kell akadályozni a talaj erőteljes kiszáradását és összepréselődését (15).

Ha a téli időszakban (a talaj fagyottsága vagy a hótakaró miatt) nehézkessé válik a mintavétel, akkor üvegházban, növénytakaró (pl. fű vagy fű/lóhere keverék) alatt tárolt készletekből is vehető talajminta. A frissen gyűjtött talajokon végzett vizsgálatok a legelőnyösebbek, de ha a begyűjtött és feldolgozott talajt a vizsgálatok megkezdése előtt tárolni kell, akkor a mikrobiális aktivitás megőrzése érdekében ez csak megfelelő körülmények között és csak korlátozott ideig (4 ± 2 °C-on legfeljebb három hónapig) megengedett ([2]). A biológiai átalakulási kísérletekhez alkalmazott talajok begyűjtésével, kezelésével és tárolásával kapcsolatos részletes instrukciók a (8), (10), (15), (26) és (27) hivatkozásban találhatók.

([1]) A talajok vízvisszatartási jellemzői mérhetők szántóföldi kapacitásként, vízmegtartó kapacitásként vagy vízszívó erőként (pF). A magyarázatokat lásd az 1. függelékben. A vizsgálati jelentésben ki kell térni arra, hogy a talajok vízvisszatartási jellemzőit és térfogatsűrűségét érintetlen szántóföldi mintákban vagy vagy megbolygatott (feldolgozott) mintákban mérték-e.

([2]) A legfrissebb kutatási eredmények szerint –20 °C -on a mérsékelt éghajlatról származó talajok három hónapnál tovább is eltarthatók (28) (29) anélkül, hogy szignifikánsan csökkenne a mikrobiális aktivitás.

▼B

Mielőtt a feldolgozott talaj felhasználásra kerülne ehhez a vizsgálathoz, a mintákat elő kell inkubálni a csírázás lehetővé tétele és a magok eltávolítása, valamint a mikrobiális anyagcsere-egyensúlynak a mintavételi vagy tárolási körülményekről az inkubációs körülményekre való átállást követően történő helyreállítása érdekében. Általában megfelelő, ha az előinkubálást 2–28 napig végezzük olyan hőmérsékleten és olyan nedvesség mellett, amely nagyjából megközelíti a vizsgálati körülményekre jellemző viszonyokat (15). A tárolás és előinkubálás együttes időtartama nem haladhatja meg a három hónapot.

1.9. A VIZSGÁLAT VÉGREHAJTÁSA

1.9.1. **Vizsgálati körülmények**

1.9.1.1. *Vizsgálati hőmérséklet*

A talajokat a vizsgálat teljes időtartama alatt sötétben és olyan állandó hőmérsékleten kell inkubálni, amely reprezentatív a használat vagy kibocsátás területén uralkodó éghajlati viszonyokra. Az ajánlott hőmérséklet minden olyan vizsgálandó anyag esetében 20 ± 2 °C, amelyek mérsékelt éghajlaton bejuthatnak a talajba. A hőmérsékletet nyomon kell követni.

A hidegebb éghajlatokon (pl. az északi országokban vagy az őszi-téli időszakban) alkalmazott vagy kibocsátott anyagok esetében további talajmintákat is inkubálni kell, de alacsonyabb hőmérsékleten (pl. 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Nedvességtartalom*

Az aerob körülmények között végzett átalakulási vizsgálatok esetében a talaj nedvességtartalmát ([1]) úgy kell beállítani, hogy a pF-értéket 2,0 és 2,5 között tartsuk (3). A talaj nedvességtartalmát víztömeg/száraz talaj tömeg egységben kell kifejezni, és rendszeresen ellenőrizni kell (például kéthetente) inkubációs lombik tömegének megmérésével, és a vízveszteség víz (lehetőleg sterilszűrt csapvíz) hozzáadásával történő kompenzálásával. Figyelni kell arra, hogy a víz hozzáadásakor megakadályozzuk vagy minimálisra csökkentsük a vizsgálandó anyag és/vagy az átalakulási termékek párolgási és/vagy esetleges fotodegradációs veszteségeit.

Az anaerob vagy rizsföldi körülmények között végzett átalakulási vizsgálatoknál a talajt elárasztással kell víztelítetté tenni.

1.9.1.3. *Aerob inkubációs körülmények*

Az átfolyásos rendszerekben az aerob körülményeket a rendszer időről időre vízzel történő átöblítésével vagy nedves levegő folyamatos átfúvásával kell fenntartani. A biométer lombikokban a légcserét diffúzió segítségével kell fenntartani.

1.9.1.4. *Steril aerob körülmények*

A vizsgálandó anyag abiotikus átalakulásának jelentőségével kapcsolatban úgy nyerhetők információk, hogy a mintákat sterilezzük (a sterilezési módszereket lásd a (16) és (29) hivatkozásban), hozzáadjuk a steril vizsgálandó anyagot (például az oldat sterilszűrőn keresztül történő hozzáadásával) és nedves levegővel átszellőztetjük, az 1.9.1.3. szakaszban leírtak szerint. A rizstalajok esetében a talajt és a vizet sterilizálni kell, az inkubálást pedig az 1.9.1.6. szakaszban leírtak szerint kell végezni.

([1]) A talaj nem lehet sem túl nedves, sem túl száraz annak érdekében, hogy fenntartható legyen a talaj mikroflórájának megfelelő szellőzése és tápanyagellátása. Az optimális mikrobanövekedéshez az ajánlott nedvességtartalom a víztartóképesség (WHC) 40 és 60 %-a között, illetve 0,1 és 0,33 bar között mozog (6). Ez utóbbi tartomány pF 2,0–2,5-nek felel meg. A különböző talajtípusok tipikus nevességtartalma a 2. függelékben található.

▼B

1.9.1.5. *Anaerob inkubációs körülmények*

Anaerob körülmények kialakításához és fenntartásához a vizsgálandó anyaggal kezelt és 30 napig vagy egy felezési időig vagy egy DT_{50}-ig (amelyik a három közül a legrövidebb) aerob körülmények között inkubált talajt vízzel kell elárasztani (1–3 cm-es vízréteg), az inkubációs rendszert pedig inert gázzal (például nitrogénnel vagy argonnal) kell átöblíteni ([1]). A vizsgálati rendszernek lehetővé kell tennie a különféle méréseket, így például a pH, az oxigénkoncentráció és a redoxpotenciál meghatározását, továbbá csapdákat is tartalmaznia kell az illékony termékek befogására. A biométer-típusú rendszert le kell zárni a levegő diffúzióval történő bejutásának megakadályozása érdekében.

1.9.1.6. *Rizstalajok inkubációs körülményei*

A rizstalajokban végbemenő átalakulások tanulmányozására a talajt körülbelül 1–5 cm vízréteggel kell elárasztani, majd a vizsgálandó anyagot a vízfázisba kell juttatni (9). Javasolt legalább 5 cm mélységű talajréteg alkalmazása. A rendszer levegővel átszellőztetett, ugyanúgy, mint az aerob feltételek esetén. Nyomon kell követni, és rögzíteni kell a vizes réteg pH-ját, oxigénkoncentrációját és redoxpotenciálját. Az átalakulási vizsgálatok megkezdése előtt legalább kéthetes előinkubálási időszakra van szükség (lásd az 1.8.3.2. szakaszt).

1.9.1.7. *A vizsgálat időtartama*

A sebesség- és útvonalvizsgálatok időtartama általában nem haladhatja meg a 120 napot ([2]) (3) (6) (8), mivel azt követően egy, a természetes utánpótlástól izolált mesterséges laboratóriumi rendszerben idővel a talaj mikrobiális aktivitásának csökkenése lenne várható. Ahol az a vizsgálandó anyag csökkenésének, valamint a fő átalakulási termékek képződésének és csökkenésének jellemzéséhez szükséges, a vizsgálatok meghosszabbíthatók (például 6 vagy 12 hónapra) (8). A hosszabb inkubációs időtartamokat a vizsgálati jelentésben meg kell indokolni, és csatolni kell az ilyen hosszabb időtartamok során és végén elvégzett biomasszamérések eredményeit is.

1.9.2. **A vizsgálat végrehajtása**

Minden inkubációs lombikba (lásd a 3. függelék 1. és 2. ábráját) körülbelül 50–200 g talajt (szárazsúlyra vetítve) kell behelyezni, majd azt az 1.8.2 szakaszban leírt módszerek egyikének alkalmazásával a vizsgálandó anyaggal kell kezelni. Ha a vizsgálandó anyag alkalmazásához szerves oldószert használunk, azt párologtatással el kell távolítani a talajból. A talajt ezután spatulával és/vagy a lombik rázogatásával alaposan össze kell keverni. Ha a vizsgálatot rizsföldi körülmények között végezzük, a talajt és a vizet a vizsgálandó anyag alkalmazása után alaposan össze kell keverni. A kezelt talajok kis részleteiben (pl. 1-1 g-jában) meg kell határozni a vizsgálandó anyag mennyiségét az egyenletes eloszlás ellenőrzése érdekében. Az ezt kiváltó alternatív módszert lásd lent.

([1]) A feltalajokban túlnyomóan aerob viszonyok uralkodnak és ugyanígy a felszín alatti talajokban is, ahogyan azt egy, az Európai Unió által szponzorált kutatási program (K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, fieldsite, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden] is igazolta. Anaerob feltételek csak alkalomszerűen, a talajok erős esőzések utáni elárasztásakor alakulnak ki, illetve amikor a rizsföldeket elárasztják.

([2]) Az aerob vizsgálatokat jóval a 120. nap előtt is be lehet fejezni, ha addigra egyértelműen elértük a végleges átalakítási útvonalat és a teljes mineralizációt. A vizsgálat 120 napon túl is befejezhető, illetve akkor is, ha a vizsgálandó anyag legalább 90 %-a átalakult, de csak akkor, ha már legalább 5 % CO_2 képződött.

▼B

A kezelési aránynak meg kell felelnie az adott növényvédő szer legmagasabb, a használati utasításban javasolt alkalmazási arányának, és a terepen megfelelő talaj mélységig (például a talaj felső 10 cm-es rétege ([1]) egységes beépülést kell biztosítania. A talajba való beépülés nélkül csak a levélzetre vagy a talajra alkalmazott vegyületek esetében például 2,5 cm a megfelelő mélység annak kiszámításához, hogy mennyi vegyületet kell az egyes lombikokba bejuttatni. A talajba beépülő vegyületek esetében a megfelelő mélység a használati utasításban megadott beépülési mélység. Általános vegyi anyagok esetében az alkalmazási arányt az alapján kell megbecsülni, hogy melyik a legjellemzőbb bejutási útvonal; ha a talajba jutás fő útvonala például a szennyvíziszap, a vegyületet olyan koncentrációban kell az iszapba bejuttatni, amely tükrözi az iszapban várható koncentrációt, és a talajhoz adandó iszap mennyiségének tükröznie kell a mezőgazdasági talajok normál iszapterhelését. Ha ez a koncentráció nem elég magas a fő átalakulási termékek azonosításához, hasznos lehet külön talajminták nagyobb koncentrációkkal történő inkubálása, de kerülni kell a talaj mikrobiális funkcióját befolyásoló túlzott mennyiségeket (lásd az 1.5 és az 1.8.2. szakaszt).

Vagy nagyobb mennyiségű (1-2 kg) talaj is kezelhető a vizsgálandó anyaggal, megfelelő keverő berendezésben alaposan elkeverve és végül kis, 50–200 g-os részletekben az inkubációs lombikba téve (például mintaosztók segítségével). A kezelt talaj kis (például 1 g-os) részleteiben meg kell határozni a vizsgálandó anyag mennyiségét, így ellenőrizve annak egyenletes talajbeli eloszlását. Az ilyen eljárás azért előnyös, mert lehetővé teszi a vizsgálandó anyag még egyenletesebb eloszlását a talajban.

A nem kezelt talajmintákat is ugyanolyan (aerob) körülmények között kell inkubálni, mint a vizsgálandó anyaggal kezelt mintákat. Ezeket a mintákat a biomasszának a vizsgálat során és végén történő meghatározására kell felhasználni.

Ha a vizsgálandó anyagot szerves oldószer(ek)ben történő feloldás után visszük fel a talajra, az azonos mennyiségű oldószerrel vagy oldószerekkel kezelt talajmintákat ugyanolyan (aerob) körülmények között kell inkubálni, mint a vizsgálandó anyaggal kezelt mintákat. Ezeket a mintákat a vizsgálatok elején, alatt és végén végzett biomasszamérésekhez kell felhasználni, amelyekkel az oldószer(ek)nek a mikrobás biomasszára gyakorolt esetleges hatásai mérhetők fel.

A kezelt talajokat tartalmazó lombikokat vagy az 1. ábrán bemutatott átfolyásos rendszerhez kell kapcsolni, vagy a 2. ábrán bemutatott adszorpciós oszloppal kell lezárni (lásd a 3. függeléket).

([1]) A kiindulási koncentráció területi alapon történő kiszámítása a következő egyenlet segítségével:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{soil}/m^3]}$$

C_{soil} = kiindulási koncentráció a talajban [$mg \cdot kg^{-1}$]

A = alkalmazásiarány [$kg \cdot ha^{-1}$]; l = a szántóföldi talajréteg vastagsága [m]; d=a talaj száraz térfogat sűrűsége [$kg \cdot m^{-3}$].

Általános szabály, hogy az 1 $kg \cdot ha^{-1}$ alkalmazási arány a talaj felsi, mintegy 10cm-es rétegében 1 $mg \cdot kg^{-1}$ koncentrációt alakít ki (feltéve, hogy a térfogatsűrűség 1 $g \cdot cm^{-3}$).

▼B

1.9.3. **Mintavétel és mérés**

Megfelelő időközönként párhuzamos inkubációs lombikokat kell eltávolítani, és a talajmintákat megfelelő, különböző polaritású oldószerekkel kell extrahálni, majd meg kell határozni bennük a vizsgálandó anyagot és/vagy az átalakulási termékeket. Egy jól megtervezett vizsgálatban elegendő számú lombikot használunk ahhoz, hogy minden egyes mintavételi időpontban két lombikból tudjuk mérést végezni. Az egyes talajminták inkubálása során és végén különböző időközönként (az első hónapban 7 naponta, majd utána 17 naponta) el kell távolítani az adszorpciós oldatot vagy szilárd adszorpciós anyagot, és meg kell bennük határozni az illékony termékeket. A közvetlenül az alkalmazás után vett talajmintán (0. napi minta) kívül legalább öt további mintavételi pontot kell beiktatni. Az időközöket úgy kell megválasztani, hogy meghatározható legyen a vizsgálandó anyag csökkenésének mintázata és az átalakulási termékek képződésének és csökkenésének mintázata (például 0., 1., 3., 7. nap; 2, 3 hét; 1, 2, 3 hónap stb.).

^{14}C-jelölt vizsgálandó anyag alkalmazása esetén a nem extrahálható radioaktivitást égetéssel kell meghatározni, és minden egyes mintavételi intervallumra anyagmérleget kell számítani.

Az anaerob és a rizstalajos inkubálás esetén a talajban és a vizes fázisban együttesen kell meghatározni a vizsgálandó anyagot és az átalakítási termékeket, vagy az extrahálás és mérés előtt szűréssel vagy centrifugál ással kell szétválasztani őket.

1.9.4. **Opcionális vizsgálatok**

A hőmérsékletnek és a talajnedvességnek a vizsgálandó anyag és/vagy átalakítási termékei talajbeli átalakulására gyakorolt hatásának becsléséhez hasznos lehet, ha más hőmérsékleteken és talajnedvességek mellett is végzünk aerob, nem steril vizsgálatokat.

A nem extrahálható radioaktivitás további jellemzése megkísérelhető például szuperkritikus folyadékextrakcióval is.

2. **ADATOK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

A vizsgálandó anyag, az átalakulási termékek, az illékony anyagok (csak %-osan), és a nem extrahálható rész mennyiségét minden egyes mintavételi intervallumra az alkalmazott kiindulási koncentráció %-ában, illetve adott esetben $mg.kg^{-1}$ talaj (szárazsúlyra vetítve) egységben kell megadni. Az alkalmazott kiindulási koncentráció százalékában anyagmérleget is fel kell állítani minden egyes mintavételi intervallumra. A vizsgálandó anyag koncentrációit az idő függvényében ábrázolva megbecsülhető a vizsgálandó anyag átalakulásának felezési ideje vagy DT_{50}-értéke. Meg kell határozni a fő átalakulási termékeket, valamint ezek koncentrációját is fel kell venni az idő függvényében, hogy képződési és csökkenési sebességük megállapítható legyen. Fő átalakulási termék minden olyan termék, amely a vizsgálat során bármikor az alkalmazott dózis legalább 10 %-nak megfelelő mennyiségben van jelen.

A befogott illékony termékek is adhatnak némi információt a vizsgálandó anyag és annak átalakulási termékei talajból való elillanási hajlamáról.

▼B

A felezési idő vagy DT_{50}-értékek, illetve adott esetben a DT_{75}- és DT_{90}-értékek pontosabb meghatározását megfelelő kinetikai modellszámítások alkalmazásával kell elvégezni. A felezési időt és a DT_{50}-értékeket az alkalmazott modell leírásával, a kinetika rendűségével és a determinációs koefficienssel (r_2) együtt kell a jelentésben feltüntetni. Az elsőrendű kinetikát kell előnyben részesíteni, kivéve, ha $r_2 < 0{,}7$. Adott esetben a számításokat a fő átalakulási termékekre is alkalmazni kell. A megfelelő modellekre példák a (31)–(35) hivatkozásban találhatók.

A sebességvizsgálatok több különböző hőmérsékleten történő végzése esetén az átalakítási sebességeket kísérleti hőmérséklet tartományon belül a hőmérséklet függvényében kell leírni az alábbi Arrhenius-összefüggés alkalmazásával:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ vagy } \ln k = 1nA - \frac{B}{T},$$

ahol In A és B az In k-nak az l/T függvényében való lineáris regressziójával előállított legjobb illesztésű egyenes tengelymetszetéből és meredekségből származó regressziós állandók; a k a T hőmérsékletnél kapott sebességi állandó; T pedig a hőmérséklet Kelvinben megadva. Ügyelni kell arra, hogy abban az esetben, ha az átalakítást a mikrobiális hatás szabályozza, akkor az Arrhenius-összefüggés csak egy igen korlátozott hőmérsékleti tartományban lesz érvényes.

2.2. ÉRTÉKELÉS ÉS AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

Bár a vizsgálatokat mesterséges laboratóriumi rendszerekben végezzük, az eredmények lehetővé teszik a vizsgálandó anyagok átalakulási sebességének, valamint az átalakulási termékek képződési és csökkenési sebességének szántóföldi körülmények közötti becslését (36) (37).

A vizsgálandó anyag átalakulási útvonalának vizsgálata információt szolgáltat arról, hogy az alkalmazott anyag szerkezete milyen változásokon megy keresztül a talajban a kémiai és mikrobiális reakciók hatására.

3. **JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

— hétköznapi név, kémiai elnevezés, CAS-szám, szerkezeti képlet (radioaktívan jelölt anyagok alkalmazása esetén a jelölés(ek) elhelyezkedése) és a lényeges fizikai-kémiai tulajdonságok (lásd az 1.5. szakaszt),

— a vizsgálandó anyag tisztasága (szennyezései),

— a jelölt anyagok radiokémiai tisztasága és specifikus aktivitása (adott esetben).

Referenciaanyagok:

— az átalakítási termék jellemzésére és/vagy azonosítására alkalmazott referenciaanyagok kémiai elnevezése és szerkezete.

Vizsgált talajok:

— a gyűjtés helyével kapcsolatos adatok,

— a talajmintavétel időpontja és az alkalmazott eljárás,

▼B

— a talajok tulajdonságai, például a pH, a szervesszén-tartalom, a szerkezet (% homok, % iszap, % agyag), a kationcserélő kapacitás, a térfogatsűrűség, a vízvisszatartási jellemzők, és a mikrobiális biomassza,

— adott esetben a talaj tárolásának időtartama és körülményei.

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgálatok elvégzésének időpontjai,

— a vizsgálandó anyag alkalmazott mennyisége,

— az alkalmazott oldószerek és a vizsgálandó anyag alkalmazására használt módszer,

— a kezdetben kezelt és az egyes analízisek időpontjában megmintázott talaj tömege,

— az alkalmazott inkubációs rendszer ismertetése,

— légáramsebesség (csak az átfolyásos rendszerek esetében),

— a kísérleti rendszer hőmérséklete,

— a talaj nedvességtartalma az inkubálás során,

— mikrobiális biomassza az aerob vizsgálatok kezdetekor, alatt és végén,

— pH, oxigénkoncentráció és redoxpotenciál az anaerob és rizsföldi vizsgálatok kezdetekor, alatt és végén,

— extrakciós módszer(ek),

— a vizsgálandó anyagnak és fontosabb átalakulási termékeinek a talajban és az adszorpciós anyagokban történő mennyiségi és minőségi meghatározására alkalmazott módszerek,

— másolati minták és ellenőrző minták száma.

Eredmények:

— a mikrobiális aktivitás meghatározásának eredményei,

— az alkalmazott analitikai módszerek megismételhetősége és érzékenysége,

— visszanyerési arányok (egy érvényes vizsgálat %-os értékei az 1.7.1. szakaszban vannak feltüntetve),

— az alkalmazott kiindulási dózis %-ában és adott esetben $mg.kg^{-1}$ talaj (szárazsúlyra vetítve) egységben is kifejezett eredmények táblázatos összefoglalása,

— anyagmérleg a vizsgálatok közben és végén,

— a nem extrahálható (kötött) talajbeli radioaktivitás vagy maradványok jellemzése,

— a felszabaduló CO_2 és más illékony vegyületek mennyisége,

— a talajbeli koncentráció időbeli függvényének ábrázolása a vizsgálandó anyagra és adott esetben annak fő átalakulási termékeire,

— felezési idő vagy DT_{50}-, DT_{75}- és DT_{90}-értékek a vizsgálandó anyagra és adott esetben annak fő átalakulási termékeire, a konfidenciahatárokkal együtt,

▼B

— a steril körülmények közötti abiotikus lebontási sebesség becslése,

— a vizsgálandó anyag és adott esetben annak fő átalakulási termékei átalakulási kinetikájának becslése,

— adott esetben az átalakítás javasolt útvonalai,

— az eredmények tárgyalása és értelmezése,

— nyers adatok (minta kromatogramok, átalakítási sebességek mintaszámításai, és az átalakulási termékek azonosításnak módja).

4. **SZAKIRODALOM**

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. Európai Unió (EU) (1995). A Bizottság 1995. július 14-i 95/36/EK irányelve a növényvédő szerek forgalomba hozataláról szóló 91/414/EGK tanácsi irányelv módosításáról. AII. melléklet A. része és III. melléklet A. része: A növényvédő szerek sorsa és viselkedése a környezetben.

4. Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

5. BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

6. ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions. (Talajminőség. Útmutató a talajban levő szerves vegyi anyagok aerob feltételek melletti biológiai lebonthatóságának laboratóriumi vizsgálatára.)

7. ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions. (Talajminőség. Laboratóriumi inkubációs rendszerek a talajban lévő szerves vegyi anyagok aerob feltételek mellett végbemenő mineralizációjának vizsgálatához)

8. SET AC (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. (Talajminőség – Mintavétel – A mikrobiális folyamatok laboratóriumi értékelésére szolgáló talaj begyűjtésére, kezelésére és tárolására vonatkozó iránymutatás.)

16. A 67/548/EGK irányelv V. melléklete.

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. AL. 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. (Talajminőség. A talaj mikrobiális biomasszájának meghatározása. 1. rész: Szubsztrát-indukált respirációs módszer. 2. rész: Gőzextrakciós módszer.)

26. Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

27. Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 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 DL, Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.

37. Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

▼B

1. függelék

VÍZSZÍVÓ ERŐ, SZÁNTÓFÖLDI VÍZKAPACITÁS (FC) ÉS VÍZTARTÓ KÉPESSÉG (WHC) ([1])

A vízoszlop magassága [cm]	pF ([a])	bar ([b])	Megegyzések
10^7	7	10^4	Száraz talaj
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Hervadáspont
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 ([c])	Szántóföldi vízkapacitás tartomány ([d])
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (közelítés)
1	0	0,001	Vízzel telített talaj

([a]) pF = a vízoszlopmagasság cm-ben kifejezett értékéknek logaritmusa.
([b]) 1 bar = 10^5 Pa.
([c]) Homokban körülbelül 10 %-os, vályogban körülbelül 35 %-os, agyagban pedig körülbelül 45 %-os víztartalomnak felel meg.
([d]) A szántóföldi vízkapacitás nem állandó, hanem talajtípusként eltérő, és pF 1,5 és 2,5 között változik.

A vízszívó erőt vízoszlop-cm vagy bar mértékegységben mérjük. A szívóerő nagysága igen széles tartományban mozoghat, ezért egyszerűen csak pF-értékként adjuk meg, amely a vízoszlop-cm érték logaritmusa.

A szántóföldi vízkapacitás azt a vízmennyiséget jelenti, amelyet egy természetes talaj egy hosszabb esőzés vagy kellő mértékű öntözés után 2 nappal gravitáció ellenében tárolni tud. A szántóföldi vízkapacitást érintetlen talajban, in situ, a terepen határozzák meg. A mérés tehát nem alkalmazható megbolygatott, laboratóriumi talajmintákra. A megbolygatott mintákban meghatározott FC-értékek nagyobb szisztematikus varianciát mutathatnak.

A víztartó képességet (WHC) laboratóriumban határozzák meg érintetlen és megbolygatott talajokban úgy, hogy egy talajoszlopot kapilláris transzport útján vízzel telítenek. Különösen jól alkalmazható megbolygatott talajok esetében, és akár 30 %-kal is meghaladhatja a szántóföldi vízkapacitást (1). Emellett egyszerűbben meghatározható kísérletileg, mint a megbízható FC-értékek.

Megjegyzések

([1]) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

2. függelék

KÜLÖNBÖZŐ ORSZÁGOKBÓL SZÁRMAZÓ KÜLÖNBÖZŐ TALAJTÍPUSOK NEDVESSÉGTARTALMA (G VÍZ/100 G SZÁRAZ TALAJ)

Talajtípus	Ország	Talajnedvesség		
		WHC ([1])	pF = 1,8	pF = 2,5
Homok	Németország	28,7	8,8	3,9
Vályogos homok	Németország	50,4	17,9	12,1
Vályogos homok	Svájc	44,0	35,3	9,2
Iszapos vályog	Svájc	72,8	56,6	28,4
Agyoagos vályog	Brazília	69,7	38,4	27,3
Agyoagos vályog	Japán	74,4	57,8	31,4
Homokos vályog	Japán	82,4	59,2	36,0
Iszapos vályog	USA	47,2	33,2	18,8
Homokos vályog	USA	40,4	25,2	13,3

([1]) Víztartó képesség

▼B

3. függelék

1. ábra

Példa vegyi anyagok talajbeli átalakulásának vizsgálatára szolgáló át folyásos készülékre ([1]) ([2])

1: tűszelep

2: vizet tartalmazó gázmosó üveg

3: ultramembrán (csak steril körülmények esetén), pórus-méret: 0,2 µm

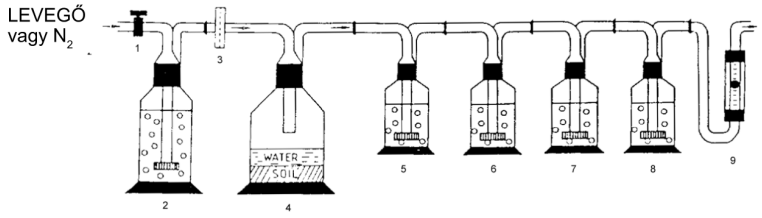
4: talajanyagcsere-palack (vizes elárasztás csak anaerob vagy rizsföldi mérési körülmények esetén)

5: etilén-glikol-csapda az illékony szerves vegyületekhez

6: kénsavcsapda a lúgos illékony vegyületekhez

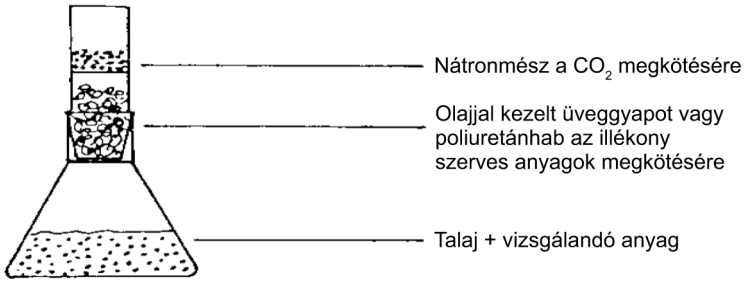
7, 8: nátrium-hidroxid-csapda a CO_2-höz és más savas illékony vegyületekhez

9: áramlásmérő.



2. ábra

Példa vegyi anyagok talajbeli átalakulásának vizsgálatára szolgáló biométer-típusú lombikra ([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. **AEROB ÉS ANAEROB ÁTALAKÍTÁS VÍZI ÜLEDÉKRENDSZEREKBEN**

1. **MÓDSZER**

Ez a vizsgálati módszer az OECD TG 308 (2002) módszer megfelelője.

1.1. BEVEZETÉS

A sekély és mély felszíni vizekbe a vegyi anyagok például a következő útvonalakon keresztül juthatnak be: közvetlen alkalmazás, permetszéthordás, felszíni elfolyás, belvízelvezetés, hulladéklerakás, ipari, háztartási vagy mezőgazdasági szennyvizek és légköri kiülepedés. Ez a vizsgálati módszer egy olyan laboratóriumi módszert ismertet, amellyel szerves anyagok aerob és anaerob átalakulását vizsgálhatjuk vízi üledékrendszerekben. Ez a módszer meglévő irányelveken alapul (1) (2) (3) (4) (5) (6). Az 1995-ben az olaszországi Belgirateban megrendezett, a talajok/üledékek kiválasztásával kapcsolatos OECD-munkaértekezleten (7) megegyezés született az e vizsgálatban alkalmazandó üledékek számáról és típusáról. A munkaértekezlet egy ISO Útmutató (8) alapján ajánlásokat fogalmazott meg az üledékminták gyűjtéséről, kezeléséről és tárolásáról is. Az ilyen vizsgálatokra olyan vegyi anyagok esetében van szükség, amelyek közvetlenül a vizekbe kerülnek, vagy amelyek a fenti útvonalakon át valószínűleg bekerülnek a vízi környezetbe.

A természetes vízi üledékrendszerekben a felső vízfázis gyakran aerob. Az üledék felszíni rétege lehet aerob vagy anaerob is, a mélyebb üledék viszont általában anaerob. Ez a dokumentum aerob és anaerob vizsgálatokat is ismertet annak érdekében, hogy a fenti lehetőségek mindegyikét felölelje. Az aerob vizsgálat egy aerob üledékréteg felett elhelyezkedő aerob vízoszlopot szimulál, ahol az aerob üledékréteget alulról egy anaerob gradiens határolja. Az anaerob vizsgálat egy teljesen anaerob víz-üledék rendszert szimulál. Ha a körülmények arra utalnak, hogy jelentős mértékben el kell térni az itt megfogalmazott ajánlásoktól, például amiatt, hogy ép üledékmagokat vagy olyan üledékeket használunk, amelyek esetleg érintkezésbe léphettek a vizsgálandó anyaggal, akkor a célra más módszerek is rendelkezésre állnak (9).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Minden esetben SI (Standard International) egységeket kell használni.

„Vizsgálandó anyag”: bármely anyag, legyen az a kiindulási vegyület, vagy megfelelő átalakulási termék.

„Átalakulási termékek”: minden olyan anyag, amely a vizsgálandó anyag biotikus és abiotikus átalakulási reakcióiban keletkezik, ideértve a CO_2-t és minden kötött maradványt is.

„Kötött maradványok”: a „kötött maradványok” a talajban, növényekben vagy állatokban jelen lévő olyan vegyületek, amelyek a kiindulási anyag vagy anyagcseretermék(i) formájában extrakció után is a mátrixban maradnak. Az extrakciós módszer alapjában véve nem változtathatja meg magukat a vegyületeket vagy a mátrix szerkezetét. A kötés jellege részben mátrixmódosító extrakciós módszerek, illetve kifinomult analitikai technikák segítségével tisztázható. Ez idáig kovalens, ionos és szorpciós kötéseket, valamint zárványokat azonosítottak ilyen módon. A kötött maradványok létrejötte általában szignifikánsan csökkenti a biológiai elérhetőséget és biológiai hozzáférhetőséget (10) [az IUPAC 1984-ben módosította (11)].

▼B

„Aerob átalakulás”: (oxidáló): molekuláris oxigén jelenlétében végbemenő reakciók (12).

„Anaerob átalakulás”: (redukáló): molekuláris oxigén kizárásával végbemenő reakciók (12).

„Természetes vizek”: tavakból, folyókból, patakokból stb. származó felszíni vizek.

„Üledék”: ásványi és szerves kémiai komponensek keveréke, amelyek közül az utóbbiak magas szén- és nitrogéntartalmú és nagy molekulasúlyú vegyületek. A természetes vizekből ülepednek ki és azzal határfelületet képeznek.

„Mineralizáció”: a szerves vegyületek teljes mértékű lebomlása aerob körülmények között CO_2-dá és H_2O-zé, illetve anaerob körülmények között CH_4-ná, CO_2-dá és H_2O-zé. E vizsgálati módszer vonatkozásában radioaktívan jelölt vegyületek alkalmazásakor a mineralizáció egy molekula nagyfokú lebomlását jelenti, amelynek során egy jelölt szénatom kvantitatívan oxidálódik vagy redukálódik, és az ennek megfelelő mennyiségű $^{14}CO_2$, illetve $^{14}CH_4$ szabadul fel.

„Felezési idő”: $t_{0,5}$, a vizsgálandó anyag 50 %-ának átalakulásához szükséges idő, ha az átalakulás elsőrendű kinetikával írható le; a felezési idő független a kiindulási koncentrációtól.

„DT_{50} (lebomlási idő **50)”**: az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag kiindulási koncentrációja 50 %-kal csökken.

„DT_{75} (lebomlási idő **75)”**: az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag kiindulási koncentrációja 75 %-kal csökken.

„DT_{90} (lebomlási idő **90)”**: az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag kiindulási koncentrációja 90 %-kal csökken.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Az átalakulási termékek spektroszkópiás és kromatográfiás módszerekkel történő azonosításához és/vagy mennyiségi méréséhez referenciaanyagokat kell alkalmazni.

1.4. A VIZSGÁLANDÓ ANYAGGAL KAPCSOLATOS INFORMÁCIÓK

Az átalakulás sebességének mérésére nem jelölt vagy izotóppal jelölt vizsgálandó anyagot is alkalmazhatunk, bár előnyben kell részesíteni a jelölt anyagokat. Jelölt anyagra olyankor van szükség, ha az átalakulási útvonalakat kívánjuk tanulmányozni vagy anyagmérleget akarunk felvenni. A ^{14}C jelölés az ajánlott, de más izotópok, így például ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H vagy ^{32}P is alkalmazható. A jelölést lehetőleg a molekula legstabilabb részén vagy részein kell elhelyezni ([1]). A vizsgálandó anyag kémiai és/vagy radiokémiai tisztaságának legalább 95 %-nak kell lennie.

A vizsgálat elvégzése előtt az alábbi információkkal kell rendelkezni a vizsgálandó anyagról:

a) oldhatóság vízben (A.6. módszer);

b) oldhatóság szerves oldószerekben;

c) gőznyomás (A.4. módszer) és Henry-állandó;

([1]) Ha például a vizsgálandó anyag egy gyűrűt tartalmaz, akkor ezt a gyűrűt kell megjelölni. Ha a vizsgálandó anyag két vagy több gyűrűt is tartalmaz, esetleg külön vizsgálatot kell végezni az egyes jelölt gyűrűk sorsának megismeréséhez, illetve az átalakulási termékek keletkezésével kapcsolatos információk összegyűjtéséhez.

▼B

d) n-oktanol/víz megoszlási hányados (A8. módszer);

e) adszorpciós koefficiens (adott esetben K_d, K_f vagy K_{oc}) (C.18. módszer);

f) hidrolízis (C7. módszer);

g) disszociációs állandó (pK_a) [112. számú OECD Útmutató] (13);

h) vizsgálandó anyag kémiai szerkezete és adott esetben az izotópjelölés(ek) elhelyezkedése.

Megjegyzés: A jelentésben azt is fel kell tüntetni, hogy a méréseket milyen hőmérsékleten végeztük.

További hasznos információk lehetnek a vizsgálandó anyag mikroorganizmusokra gyakorolt toxicitásával kapcsolatos információk, a gyors és/vagy inherens biológiai lebonthatósággal kapcsolatos adatok, valamint a talajbeli aerob és anaerob átalakulással összefüggő adatok.

Rendelkezésre kell hogy álljanak a vizsgálandó anyagoknak és átalakulási termékeiknek vízben és üledékben történő mennyiségi és minőségi meghatározására szolgáló analitikai módszerek (ezen belül az extrakciós és edényzettisztítási módszerek) (lásd az 1.7.2. szakaszt).

1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az itt ismertetett módszer egy aerob és egy anaerob vízi üledékrendszert (lásd az 1. függeléket) alkalmaz, amely lehetővé teszi, hogy:

(i) mérjük a vizsgálandó anyag átalakulásának sebességét a vízüledék rendszerben;

(ii) mérjük a vizsgálandó anyag átalakulásának sebességét az üledékben;

(iii) mérjük a vizsgálandó anyag és/vagy átalakulási termékei mineralizációjának sebességét (ha ^{14}C-jelölt vizsgálandó anyagot alkalmazunk);

(iv) azonosítsuk és mennyiségileg is meghatározzuk az átalakulási termékeket a víz- és az üledékfázisban, és ezen belül anyagmérleget is készítsünk (ha jelölt vizsgálandó anyagot alkalmazunk);

(v) sötétben (például az algavirágzást elkerülendő) és állandó hőmérsékleten történő inkubálással mérjük a vizsgálandó anyag és átalakulási termékei megoszlását a két fázis között. Ha az adatok indokolják, meg kell határozni a felezési időt, valamint a DT_{50}-, DT_{75}- és DT_{90}-értékeket is, de a kísérleti időszakot jóval meghaladó időtartamokra nem szabad extrapolálni (lásd az 1.2. szakaszt).

Legalább két-két üledékre és a hozzájuk kapcsolódó vizekre van szükség az aerob, illetve az anaerob vizsgálatokhoz (7). Lehetnek azonban olyan esetek is, amikor több mint kétféle vízi üledéket kell használni, így például olyan vegyi anyag esetében, amely édesvizekben és/vagy tengeri környezetben is megjelenhet.

▼B

1.6. A VIZSGÁLAT ALKALMAZHATÓSÁGA

A módszer bármilyen kémiai anyaghoz alkalmazható (legyen az nem jelölt vagy jelölt anyag), amelyhez létezik kielégítően pontos és érzékeny analitikai módszer. Enyhén illékony, nem illékony, vízben oldható és vízben kevéssé oldható vegyületekre is alkalmazható. A vizsgálat nem alkalmazható olyan vegyületekre, amelyek a vízben nagymértékben illékonyak (pl. gázalakú növényvédő szerek, szerves oldószerek), és ezért nem lehet őket a vizsgálat kísérleti körülményei között a vízben és/vagy az üledékben tartani.

A módszerrel az eddigiekben vegyi anyagok édesvizekben és üledékeikben történő átalakulását vizsgálták, de elvben torkolati/tengeri rendszerekhez is alkalmazható. Nem alkalmas azonban folyóvízi vagy nyílttengeri körülmények szimulálására.

1.7. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

1.7.1. **Kinyerési fok**

A vizsgálandó anyag hozzáadása után azonnal legalább két párhuzamos víz- vagy üledékminta extraktumát elemezve kaphatjuk az analitikai módszer ismételhetőségével és a vizsgálandó anyag alkalmazására szolgáló eljárás egységességével kapcsolatos első információkat. A kísérletek későbbi szakaszában a kinyerési fokokat a vonatkozó anyagmérlegek adják (ha jelölt anyagot alkalmazunk). Jelölt vegyi anyagok esetén 90 % és 110 % közé (6), nem jelölt vegyi anyagok esetén pedig 70 % és 110 % közé kell esnie a kinyerési foknak.

1.7.2. **Az analitikai módszer ismételhetősége és érzékenysége**

A vizsgálandó anyag és átalakulási termékei mennyiségi meghatározására használt analitikai módszer ismételhetőségét az átalakulási termékek megjelenéséhez elegendő ideig végzett inkubálás után a vízből vagy üledékből egy extrahálással nyert kivonat két párhuzamos mérésével ellenőrizhetjük (a kezdeti extrakciós hatásfok kivételével).

Az adott vizsgálandó anyagra és átalakulási termékeire az analitikai módszer kimutatási határának (limit of detection, LOD) vízben vagy üledékben legalább 0,01 $mg.kg^{-1}$-nak (mint vizsgálandó anyag), vagy – ha az a kisebb – egy vizsgálati rendszerben alkalmazott kiindulási mennyiség 1 %-ának kell lennie. Meg kell állapítani emellett a mennyiségi meghatározás határát (limit of qualification, LOQ) is.

1.7.3. **Az átalakulási adatok pontossága**

Ha a vizsgálandó anyag koncentrációjának időfüggvényét regressziós analízisnek vetjük alá, akkor megfelelő információkat kaphatunk az átalakulási görbe pontosságáról, és lehetővé válik a konfidenciahatárok kiszámítása a felezési időkhöz (pszeudo-elsőrendű kinetika esetén) vagy a DT_{50}-értékekhez, illetve adott esetben a DT_{75}- és DT_{90}-értékekhez is.

1.8. A MÓDSZER ISMERTETÉSE

1.8.1. **Vizsgálati rendszer és készülék**

A vizsgálatot üvegedényekben (pl. palackokban és centrifugacsövekben) kell végezni, kivéve ha az előzetes információk (így például az n-oktanol/víz megoszlási hányados, a szorpciós adatok stb.) szerint a vizsgálandó anyag megtapadhat az üvegfelületen, ilyenkor esetleg fontolóra kell venni más szerkezeti anyag (így például teflon) alkalmazását. Az alábbi módszerek alkalmazásával enyhíthetjük a problémát, ha ismert, hogy a vizsgálandó anyag megtapad az üvegfelületen:

▼B

— meghatározzuk az üvegfelülethez kötődő vizsgálandó anyag és átalakulási termékek tömegét,

— a vizsgálat végén minden üvegedényt oldószerrel mosunk,

— formulázott terméket alkalmazunk (lásd még az 1.9.2. szakaszt),

— a vizsgálandó anyagot nagyobb mennyiségű társoldószerrel együtt vezetjük be a vizsgálati rendszerbe; csak olyan társoldószert szabad használni, amely nem oldja a vizsgálandó anyagot.

A tipikus vizsgálati készülékekre, azaz a gázátfolyásos és a biométer-típusú rendszerre a 2., illetve 3. függelékben láthatunk példákat (14). További alkalmazható inkubáló rendszereket ismertet a (15) hivatkozás. A kísérleti berendezést úgy kell kialakítani, hogy lehetővé tegye a lég- vagy nitrogéncserét és az illékony termékek befogását. A berendezés méreteit pedig úgy kell megválasztani, hogy teljesüljenek a vizsgálatra vonatkozó követelmények (lásd az 1.9.1 szakaszt). A ventillációt vagy óvatos buborékoltatással, vagy a vízfelszín feletti levegő- vagy nitrogénbefújással kell biztosítani. Ez utóbbi esetben ajánlatos lehet a vizet felülről óvatosan kevertetni, hogy az oxigén vagy a nitrogén egyenletesebben oszoljon szét a vízben. Nem szabad CO_2-mentes levegőt használni, mivel az a víz pH-jának növekedését eredményezheti. Az üledék perturbációja egyik esetben sem kívánatos, és lehetőség szerint minél inkább kerülni kell. Az enyhén illékony vegyi anyagokat biométer-típusú rendszerben kell vizsgálni a vízfelszín óvatos kevertetése mellett. Alkalmazható továbbá légköri levegős vagy nitrogénes gáztérrel rendelkező zárt rendszer is, amely az illékony termékek elnyeletésére belső fiolákat tartalmaz (16). Aerob vizsgálatok esetében rendszeresen cserélni kell a gáztérben lévő levegőt, hogy kompenzálni lehessen a biomassza oxigénfogyasztását.

Az illékony átalakulási termékek gyűjtésére alkalmas elnyelető folyadékok többek között a következők: a szén-dioxidhoz 1 $mol.dm^{-3}$ koncentrációjú kálium-hidroxid- vagy nátrium-hidroxid-oldat ([1]), szerves vegyületekhez pedig az etilén-glikol, az etanol-amin vagy 2 %-os xilolos paraffinoldat. Az anaerob körülmények között képződő illékony vegyületek, mint a metán, például molekulaszitákkal köthetők meg. További lehetőség, hogy az ilyen illékony vegyületeket CuO-dal töltött kvarccsövön átvezetve 900 °C hőmérsékleten CO_2-dá oxidáljuk, és a képződött CO_2-ot lúgos abszorberben fogjuk fel (17).

A vizsgálandó anyag és az átalakulási termékek elemzéséhez különféle laboratóriumi műszerek szükségesek (pl. gáz-folyadék kromatográf [GLC], nagy teljesítményű folyadékkromatográf [HPLC], vékonyréteg-kromatográf [TLC] tömegspektrométer [MS], gázkromatográf/tömegspektrométer [GC-MS], folyadékkromatográf/tömegspektrométer [LC-MS], magmágneses rezonancia berendezés [NMR] stb.), a radioaktívan jelölt vagy nem jelölt anyagokhoz alkalmas detektorrendszerrel. Ha radioaktívan jelölt anyagot alkalmazunk, akkor folyadékszcintillációs számlálóra és oxidáló égetőkamrára is szükség van (az üledékmintáknak a radioaktivitás-mérés előtti elégetéséhez).

A fizikai, kémiai és biológiai mérésekhez (lásd az 1.8.2.2. szakasz 1. táblázatát) további szokványos laboratóriumi eszközök, illetve esetenként további üvegeszközök, vegyszerek és reagensek is szükségesek.

([1]) Mivel az ilyen lúgos elnyelető oldatok a szellőztetőlevegőben lévő, illetve az aerob kísérletekben a légzés nyomán képződő szén-dioxidot is megkötik, rendszeres időközönként cserélni kell őket, hogy meg lehessen előzni a telítődésüket és abszorpciós kapacitásuk ezzel járó csökkenését.

▼B

1.8.2. **A vízi üledékminták kiválasztása és száma**

A mintavételi helyeket minden esetben a vizsgálat céljával összhangban kell kiválasztani. A mintavételi helyek kiválasztásakor figyelembe kell venni a korábbi mezőgazdasági, ipari vagy háztartási tevékenységek vízgyűjtőre és a felvizekre gyakorolt hatását is. Nem szabad olyan üledékeket alkalmazni, amelyek az előző 4 évben a vizsgálandó anyaggal vagy szerkezeti analógjaival szennyeződtek.

1.8.2.1. *Az üledék kiválasztása*

Az aerob vizsgálatokhoz általában kétféle üledéket kell alkalmazni (7), amelyeknek szerves széntartalom és szerkezet szempontjából el kell térniük egymástól. Az egyik üledéknek legyen magas (2,5–7,5 %) szervesszén-tartalma, és legyen finomszerkezetű, a másiknak pedig legyen alacsony (0,5–2,5 %) a szervesszén-tartalma, és legyen durvaszerkezetű. A szervesszén-tartalom különbségének általában legalább 2 %-nak kell lennie. A „finomszerkezet” > 50 % [agyag + iszap] ([1]) -tartalmat, a „durvaszerkezet” pedig < 50 % [agyag + iszap]-tartalmat jelent. A két üledék [agyag + iszap]-tartalma különbségének általában legalább 20 % kell lennie. Olyan esetekben, amikor a vegyi anyag sós vizekbe is eljuthat, legalább az egyik mintaként tengeri eredetű víz-üledék rendszert kell használni.

A szigorúan anaerob vizsgálatban a két üledéket (és kapcsolódó vizeiket) a felszíni víztestek anaerob zónáiból kell venni (7). Mind az üledék-, mind pedig a vízfázist óvatosan és az oxigén kizárása mellett kell kezelni és szállítani.

Az üledékek kiválasztásakor más paraméterek is fontosak lehetnek, amelyeket minden esetben egyedileg kell fontolóra venni. Például az üledékek pH-tartománya is fontos lehet az olyan vegyi anyagok vizsgálata szempontjából, amelyeknek átalakulása és/vagy szorpciója pH-függő. A szorpció pH-függését jellemezheti a vizsgálandó anyag pK_a-értéke is.

1.8.2.2. *A víz-üledék minták jellemzése*

A táblázat összefoglalja a víz és az üledék legfontosabb mérendő és (az alkalmazott módszerre való hivatkozással együtt) rögzítendő paramétereit, valamint azt, hogy ezeket a paramétereket a vizsgálatok melyik fázisában kell meghatározni. Tájékoztatásul: alkalmas elemzési módszerek találhatók a (18), a (19), a (20) és a (21) hivatkozásban.

Esetenként még további paramétereket is mérni és jelenteni kell (pl. édesvizek esetében: lebegőanyag, lúgosság, vízkeménység, vezetőképesség, NO_3/PO_4 [arány és egyedi értékek]; az üledékek esetében: kationcserélő kapacitás, víztartó képesség, karbonáttartalom, összes nitrogén és foszfor; valamint tengeri rendszerekben a sótartalom). Különösen az anaerob átalakulás szempontjából hasznos lehet még a redoxkörülmények értékeléséhez a víz és az üledék nitrát-, szulfát-, biológiailag hozzáférhető vas- és esetleges egyéb elektronakceptor-tartalmának meghatározása is.

([1]) Az [agyag + iszap] az üledék < 50 m részecskeméretű ásványi frakciója.

▼B

A víz-üledék minták jellemzésére szolgáló paraméterek mérése (7) (22) (23).

Paraméter	A vizsgálati eljárás szakaszai					
	mintagyűjtés	mintakezelés után	akklimatizáció kezdete	vizsgálat kezdete	vizsgálat közbülső szakaszai	vizsgálat vége
Víz						
Eredetforrás	X					
Hőmérséklet	x					
pH	X		X	X	X	X
TOC			X	X		X
O_2-koncentráció*	X		X	X	X	X
Redoxpotenciál*			X	X	X	X
Üledék						
Eredetforrás	X					
A réteg mélysége	X					
pH		x	X	X	X	X
Szemcseméret-eloszlás		X				
TOC		X	X	X		X
Mikrobális biomassza (**)		X		X		X
Redoxpotenciál (*)	érzékszervi (szín/szag)		X	X	X	X

(*) A legfrissebb kutatási erednények igazolták, hogy a víz oxigénkoncentrációjának és redoxpotenciáljának mérése nem rendelkezik sem mechanisztikus, sem prediktív értékkel a felszíni vizek mikrobapopulációinak növekedése és fejlődése szempontjából (24) (25). Az aerob biológiai átalakulási sebességek és útvonalak értelmezését és értékelését jobban segíti a biológiai oxigénigény (BOI. a mintavételkor, illetve a vizsgálat kezdetén és végén), a mikro- és makrotápanyagok. a Ca, az Mg és az Mn (a vizsgálat kezdetén és végén) vízben, illetve az összes N és az összes P (a mintavételkor és a vizsgálat végén) üledékben történő meghatározása.

(**) Az aerob vizsgálatokhoz mikrobalégzési rátamódszer (26), gázzal történő fertőtlenítési módszer (27) vagy mikroszkópos számlálás (pl. baktériumok, sugárgombák, gombák és teljes kolóniák): az anaerob vizsgálatokhoz metánképződési sebesség.

1.8.3. **Mintavétel, kezelés és tárolás**

1.8.3.1. *Mintavétel*

Az üledékekből történő mintavételhez a fenéküledékek mintavételéről szóló ISO-útmutatótervezetet (8) kell használni. Az üledék teljes 5–10 cm-es felső rétegéből üledékmintákat kell venni. Az ehhez társított vizet ugyanarról a helyről kell venni, és ugyanabban az időben, mint az üledéket. Az anaerob vizsgálathoz az üledék és víz mintavételét, valamint szállítását oxigén kizárása mellett kell végezni (28) (lásd az 1.8.2.1. szakaszt). Egyes mintavevő eszközöket a (8) és a (23) hivatkozás ismertet.

▼B

1.8.3.2. *Kezelés*

Az üledéket 2 mm-es szitán végzett nedves szűréssel választjuk el a víztől, nagy feleslegben alkalmazva azonos helyről származó, helyileg elvezetett vizet. Ezt követően inkubáló lombikban ismert mennyiségű üledéket és vizet a kívánt arányban egymáshoz keverünk (lásd az 1.9.1. szakaszt), és előkészítjük az akklimatizálódási periódusra (lásd az 1.8.4. szakaszt). Az anaerob vizsgálathoz a kezelés minden lépését oxigén kizárása mellett kell végezni (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. *Tárolás*

A frissen gyűjtött üledék és víz alkalmazása a legelőnyösebb, de ha tárolás szükséges, akkor az üledéket és a vizet a fentiek szerint le kell szűrni, majd sötétben, 4 ± 2 °C-on (13), vízzel elárasztva (6-10 cm-es vízréteg) kell együtt tárolni őket, legfeljebb négy hétig (7) (8) (23). Az aerob vizsgálatokhoz alkalmazott mintákat szabad levegőbeáramlás mellett kell tárolni (pl. nyitott edényekben), az anaerob vizsgálatok esetében viszont oxigén kizárásával. Vigyázni kell arra, hogy a szállítás és tárolás során az üledék és a víz ne fagyjon ki, illetve az üledék ne száradjon ki.

1.8.4. **Az üledék/víz minták előkészítése a vizsgálathoz**

A vizsgálandó anyag hozzáadása előtt akklimatizációs időszakot kell hagyni, amelyhez minden üledék/víz mintát a fő vizsgálathoz használt inkubáló edénybe kell tenni, és az akklimatizáció idején pontosan ugyanazokat a körülményeket kell fenntartani, mint a fő vizsgálatban (lásd az 1.9.1. szakaszt). Az akklimatizációs időszak ahhoz szükséges, hogy a rendszer a pH, a víz oxigénkoncentrációja, az üledék és a víz redoxpotenciálja és a fázisok makroszkopikus elkülönülése tekintetében viszonylag stabillá váljon. Az akklimatizáció időtartama általában egy-két hét, de semmiképpen sem haladhatja meg a négy hetet. Az ebben a szakaszban végzett mérések eredményeit is fel kell tüntetni a jelentésben.

1.9. A VIZSGÁLAT ELVÉGZÉSE

1.9.1. **Kísérleti körülmények**

A vizsgálatot az inkubálóberendezésben kell végezni (lásd az 1.8.1. szakaszt) úgy, hogy a víz és az üledék térfogatának aránya 3:1 és 4:1 között legyen, az üledék vastagsága pedig 2,5 cm (± 0,5 cm) ([1]). Javasolt az egyes inkubáló edényekbe minimum 50 g üledéket (szárazsúly) tenni.

A vizsgálatot sötétben, 10 °C és 30 °C közötti állandó hőmérsékleten kell végezni. A legmegfelelőbb a (20 ± 2) °C. Egyes esetekben, a vizsgálattól várt információk függvényében fontolóra lehet venni, hogy a méréseket más, alacsonyabb hőmérsékleten (pl. 10 °C-on) is elvégezzék. Az inkubálási hőmérsékletet folyamatosan ellenőrizni kell, és a jelentésben is fel kell tüntetni.

([1]) A legutóbbi kutatások szerint a 4 °C-on való tárolás az üledék szervesszén-tartalmának csökkenését okozhatja, ami esetleg a mikrobiális aktivitás csökkenéséhet vezethet (34).

▼B

1.9.2. **A vizsgálandó anyag kezelése és alkalmazása**

A vizsgálathoz egyféle koncentrációban kell használni a vegyi anyagot ([1]). A közvetlenül a vizekbe jutott növényvédő szerek esetében a címkén lévő maximális adagolást kell a vizsgálati edényben lévő víz felszíne alapján kiszámolt maximális alkalmazási rátának venni. Minden más esetben a környezeti kibocsátásokon alapuló előrejelzések alapján kell kiválasztani az alkalmazandó koncentrációt. Ügyelni kell arra, hogy a vizsgálandó anyagot olyan koncentrációban alkalmazzuk, amely lehetővé teszi az átalakulási útvonal jellemzését, valamint az átalakulási termékek képződésének és fogyásának mérését. Olyan esetekben, amikor a vizsgálandó anyag koncentrációja a vizsgálat kezdetén közel van a kimutatási határhoz és/vagy a vizsgálandó anyag alkalmazási rátájának 10 %-át kitevő mennyiségben jelen lévő fő átalakulási termékeket nem lehet könnyen kimutatni, akkor magasabb (pl. tízszeres) dózisok alkalmazására lehet szükség. Ha azonban magasabb tesztkoncentrációkat alkalmazunk, ellenőrizni kell, hogy nem gyakorolnak-e jelentős káros hatásokat a víz-üledék rendszer mikrobális aktivitására. Ahhoz, hogy a vizsgálandó anyag állandó koncentrációban legyen jelen a különféle méretű edényekben, indokoltnak tűnhet az alkalmazott anyagmennyiség megfelelő beállítása az alapján, hogy hogyan aránylik egymáshoz az edénybeli és a terepi vízoszlopmélység (amely utóbbit 100 cm-nek feltételezzük, de ettől eltérő mélységek is alkalmazhatók). Ilyen számításra lásd a 4. függelékben található példa.

A vizsgálandó anyagot ideálisan vizes oldat formájában kell a vizsgálati rendszer vízfázisába juttatni. Ha elkerülhetetlen, akkor a vizsgálandó anyag bejuttatására és eloszlatására a vizsgálati rendszerben kis mennyiségben felhasználhatunk vízzel elegyedő oldószereket is (például acetont, etanolt), de az oldószerek mennyisége nem haladhatja meg az 1 térfogatszázalékot, és nem lehetnek káros hatásaik a vizsgálati rendszer mikrobális aktivitására. A vizsgálandó anyag vizes oldatának előállításakor is gondosan kell eljárni, és a teljes homogenitás érdekében oldatkészítő oszlopot vagy előkeverést is lehet alkalmazni. Érdemes a vizes fázist óvatosan megkeverni, miután a vizes oldatot a rendszerbe juttattuk, vigyázva arra, hogy az üledéket a lehető legkevésbé keverjük fel.

Formulázott termékek alkalmazása általában nem ajánlott, mivel a készítmény összetevői befolyásolhatják a vizsgálandó anyag és/vagy az átalakulási termékek megoszlását a víz- és az üledékfázis között. A vízben rosszul oldódó vizsgálandó anyagok esetében azonban megfelelő alternatíva lehet a formulázott anyag alkalmazása.

Az inkubáló edények száma a mintavétel gyakoriságától függ (lásd az 1.9.3. szakaszt). Megfelelő számú vizsgálati rendszert kell alkalmazni ahhoz, hogy minden mintavételhez két-két rendszert tudjunk felhasználni. Ha minden egyes vízi üledékrendszerhez van kontrollegység, ezeket nem szabad a vizsgálandó anyaggal kezelni. A kontrollegységeket arra használhatjuk, hogy a vizsgálat végén meghatározzuk az üledék mikrobás biomasszáját, illetve a víz és az üledék teljes szervesszén-tartalmát. A kontrollegységek közül kettőt (mindkét víziüledék-mintához egyet-egyet) arra használhatunk fel, hogy az akklimatizációs időszakban nyomon kövessük az üledékben és a vízben a megfelelő paramétereket (lásd az 1.8.2.2. szakasz táblázatát). Ha a vizsgálandó anyagot oldószerrel juttatjuk be a rendszerbe, akkor még további két kontrollegységre van szükség, hogy mérni tudjuk az oldószernek a vizsgálati rendszer mikrobális aktivitására gyakorolt káros hatásait is.

([1]) Ha az alacsonyabb koncentrációkat kellő pontossággal lehet mérni, hasznos lehet a vizsgálat elvégzése egy másik koncentrációértékkel is az olyan vegyi anyagok esetén, amelyek többféle útvonalon is bejuthatnak a felszíni vizekbe, ezért szignifikánsan eltérő koncentrációban jelenhetnek meg.

▼B

1.9.3. **A vizsgálat időtartama és a mintavétel**

A kísérlet időtartama általában nem lehet több 100 napnál (6). Akkor fejezhető be, amikor elegendő eredmény van a bomlási útvonal és a víz/üledék megoszlás lefutásának megállapítására, vagy amikor a vizsgálandó anyag 90 %-a az átalakulás és/vagy az elpárolgás miatt elfogy a rendszerből. A vizsgálat kezdetét is beleszámítva legalább hat alkalommal kell mintákat venni, ez kiegészíthető a megfelelő mintavételi rend és vizsgálati időtartam meghatározására szolgáló, opcionális előzetes vizsgálattal (lásd az 1.9.4. szakaszt), ha korábbi vizsgálatok alapján nem áll rendelkezésre elegendő adat a vizsgálandó anyagról. Hidrofób anyagok esetében a vizsgálat kezdeti szakaszában esetleg további mintavételi időpontok beiktatására is szükség lehet a víz- és üledékfázis közötti megoszlási hányados meghatározásához.

A megfelelő mintavételi időpontokban komplett inkubálóedényeket veszünk ki a vizsgálatokhoz (mindig kettőt a párhuzamos mérésekhez). Az üledéket és felette lévő vizet külön-külön analizáljuk ([1]). A felszíni vizet óvatosan kell eltávolítani, vigyázva arra, hogy eközben ne keverjük fel az üledéket. A vizsgálandó anyag és az átalakulási termékek kivonását és jellemzését megfelelő analitikai eljárásokkal kell elvégezni. Gondoskodni kell arról, hogy eltávolítsuk az esetlegesen az inkubáló edény falán vagy az illékony anyagok befogására használt elnyeletők összekötő vezetékein megtapadt anyagokat is.

1.9.4. **Opcionális előzetes vizsgálat**

Ha a vizsgálat időtartamát és a mintavételi rendet nem lehet meghatározni a vizsgálandó anyaggal kapcsolatos más vizsgálatok eredményei alapján, célszerű lehet opcionális előzetes vizsgálatot végezni a végleges vizsgálathoz javasolttal egyező körülmények között. A jelentésben a megfelelő kísérleti körülményeket és az előzetes vizsgálatok eredményeit is össze kell foglalni.

1.9.5. **Mérések és elemzések**

Minden egyes mintavételi időpontban meg kell határozni, és fel kell jegyezni a vizsgálandó anyag és az átalakulási termékek koncentrációját mind a vízben, mind az üledékben (abszolút koncentráció és az alkalmazott mennyiséghez viszonyított százalékos arány). Általában minden olyan átalakulási terméket azonosítani kell, amely bármelyik mintavételi időpontban a teljes víz-üledék rendszerben alkalmazott radioaktivitás > 10 %-át reprezentáló mennyiségben detektálható, kivéve, ha ennek elhagyása megfelelően megindokolható. Meg kell fontolni a fenti küszöbérték alatt maradó, de vizsgálat során folyamatosan növekvő mennyiségű átalakulási termékek azonosítását is, mert ezeknél tartós fennmaradásra utalhatnak az eredmények. Az esetleges perzisztencát mindig egyedileg kell értékelni és a jelentésben megfelelően indokolni.

A gáz/illékony komponens elnyelető rendszerben mért eredményeket (CO_2 és egyéb anyagok, pl. illékony szerves vegyületek) is minden mintavételi időpontra fel kell tüntetni a jelentésben. Szerepeltetni kell a mineralizációs rátákat. Meg kell adni az üledékben lévő nem extrahálható (kötött) maradványokat is minden mintavételi pontra.

([1]) Azokban az esetekben, ha az anaerob átalakulási termékek könnyen és gyorsan újraoxidálódhatnak, az anaerob körülményeket a mintavétel időtartama alatt is fenn kell tartani.

▼B

2. **ADATOK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Mindegyik mintavételre ki kell számítani a hozzáadott radioaktivitás teljes mérlegét vagy kinyerési fokát (lásd az 1.7.1. szakaszt). Az eredményeket a hozzáadott radioaktivitás százalékában kell kifejezni. A radioaktivitásnak a víz és az üledék közötti megoszlását koncentrációértékként és százalékos arányként is meg kell adni minden mintavételi időpontban.

Ki kell számolni a vizsgálandó anyag felezési idejét, DT_{50}-értékét, valamint adott esetben DT_{75}- és DT_{90}-értékét is a konfidenciahatárokkal együtt (lásd az 1.7.3. szakaszt). Információt lehet kapni a vizsgálandó anyag vízre és üledékre vonatkoztatott kiürülési sebességéről is a megfelelő kiértékelő módszerek segítségével. Ilyen módszerek például a pszeudo-elsőrendű kinetikák alkalmazása, a grafikus vagy numerikus megoldásokat alkalmazó empirikus görbeillesztési technikák, illetve a még komplexebb eljárások, amelyek például egy- vagy több-kompartmentumos modelleket alkalmaznak. Ezzel kapcsolatos további részletek a szakirodalomban találhatók (35) (36) (37).

Minden megközelítésnek megvannak a maga előnyei és hátrányai és komplexitásuk tekintetében is igen sokfélék lehetnek. Az elsőrendű kinetika feltételezése a bomlási és megoszlási folyamatok túlzott leegyszerűsítését jelentheti, de amikor lehetséges, könnyen érthető és mind a szimulációs modellek, mind a becsült környezeti koncentrációk számítása szempontjából értékes eredményt (sebességi állandó vagy felezési idő) szolgáltat. Az empirikus módszerek vagy a lineáris transzformációk jobb görbeillesztést eredményezhetnek, így pontosabban lehet becsülni a felezési időket, a DT_{50}-értékeket, valamint adott esetben a DT_{75}- és a DT_{90}-értékeket is. A kapott állandók alkalmazhatósága azonban korlátozott. A kompartmentumos (környezeti elemeket alkalmazó) modellekkel egy sor hasznos állandót kaphatunk, amelyek a kockázatfelmérések szempontjából értékesek, mivel leírják a vegyi anyag különböző környezeti elemekben végbemenő degradációját és megoszlási arányait is, továbbá felhasználhatók a fő átalakulási termékek képződéséhez és lebomlásához tartozó sebességi állandók becslésére is. A módszer kiválasztását minden esetben megfelelően indokolni kell, és a kísérletezőnek grafikusan és/vagy statisztikailag igazolnia kell az illesztés jóságát.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

— hétköznapi név, kémiai elnevezés, CAS-szám, szerkezeti képlet (radioaktívan jelölt anyagok alkalmazása esetén a jelölés(ek) elhelyezkedése) és a lényeges fizikai-kémiai tulajdonságok (lásd az 1.5. szakaszt),

— a vizsgálandó anyag tisztasága (szennyezései),

— a jelölt vegyi anyagok radiokémiai tisztasága és moláris aktivitása (adott esetben).

▼B

Referenciaanyagok:

— az átalakulási termék jellemzésére és/vagy azonosítására alkalmazott referenciaanyagok kémiai elnevezése és szerkezete.

A vizsgálathoz használt üledékek és vizek:

— a vízi üledékminták vételének mintavételi helye(i) és ez(ek) ismertetése, ezen belül lehetőleg a korábbi szennyezések története,

— a víz-üledék rendszerek gyűjtésével, esetleges tárolásával és akklimatizációjával kapcsolatos összes információ,

— a víz-üledék minták tulajdonságai, az 1.8.2.2. szakasz táblázatában foglaltak szerint.

Kísérleti körülmények:

— az alkalmazott vizsgálati rendszerek (pl. átfolyásos, biométer, a szellőzés módja, a keverési módszer, a víz térfogata, a víz- és az üledékréteg vastagsága, a tesztedény méretei stb.),

— a vizsgálandó anyag bejuttatása a vizsgálati rendszerbe: a vizsgálatban alkalmazott koncentrációk, a párhuzamos és kontrollmérések száma, a vizsgálandó anyag alkalmazásának módja (pl. oldószer használata) stb.,

— inkubálási hőmérséklet,

— a mintavételek időpontjai,

— extrakciós módszerek és hatékonyságuk, valamint az analitikai módszerek és kimutatási határok,

— az átalakulási termékek jellemzésére/azonosítására alkalmazott módszerek,

— a kísérleti protokolltól vagy vizsgálati feltételektől való eltérések a vizsgálat folyamán.

Eredmények:

— reprezentatív elemzések nyers adatai (minden nyers adatot a GLP-archívumban kell tárolni),

— az alkalmazott analitikai módszerek ismételhetősége és érzékenysége,

— kinyerési fokok (az érvényes vizsgálat százalékértékeit az 1.7.1. szakasz adja meg),

— az alkalmazott kiindulási dózis százalékában és $mg.kg^{-1}$ egységekben kifejezett, az üledékre, vízre és teljes rendszerre vonatkoztatott (utóbbira csak százalékos) eredmények táblázatos összefoglalása a vizsgálandó anyagra, valamint adott esetben az átalakulási termékekre és a nem extrahálható radioaktivitásra is,

— anyagmérleg a vizsgálatok közben és végén,

— a vízfrakcióban, az üledékfrakcióban és a teljes rendszerben végbemenő átalakulás (ezen belül mineralizáció) grafikus megjelenítése,

— mineralizációs sebességek,

▼B

— felezési idő, DT_{50} (esetenként DT_{75} és DT_{90} is) a vizsgálandó anyagra és adott esetben annak fő átalakulási termékeire az üledékben, vízben és a teljes rendszerben, a konfidenciahatárok feltüntetésével,

— a vizsgálandó anyag és adott esetben fő átalakulási termékeinek átalakulási kinetikájának becslése,

— adott esetben az átalakítás feltételezett útvonalai,

— az eredmények diszkussziója.

4. **SZAKIRODALOM**

(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. SET AC-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, pp 1349-1354.

▼B

1. függelék

ÚTMUTATÓ AZ AEROB ÉS ANAEROB VIZSGÁLATI RENDSZEREKHEZ

Aerob vizsgálati rendszer

Az ebben a módszerben ismertetett aerob vizsgálati rendszer egy aerob vízrétegből (a tipikus oxigénkoncentráció 7 és 10 $mg.l^{-1}$ közötti) és egy üledékrétegből áll, amelynek felszíni része aerob, felszín alatti része pedig anaerob (az üledék anaerob zónájában a tipikus átlagos redoxpotenciál) 80 és –190 mV között változik). A víz felszíne felett nedvesített levegőt vezetnek át minden inkubációs egységen, hogy kellő oxigénszintet tartsanak a gáztétben.

Anaerob vizsgálati rendszer

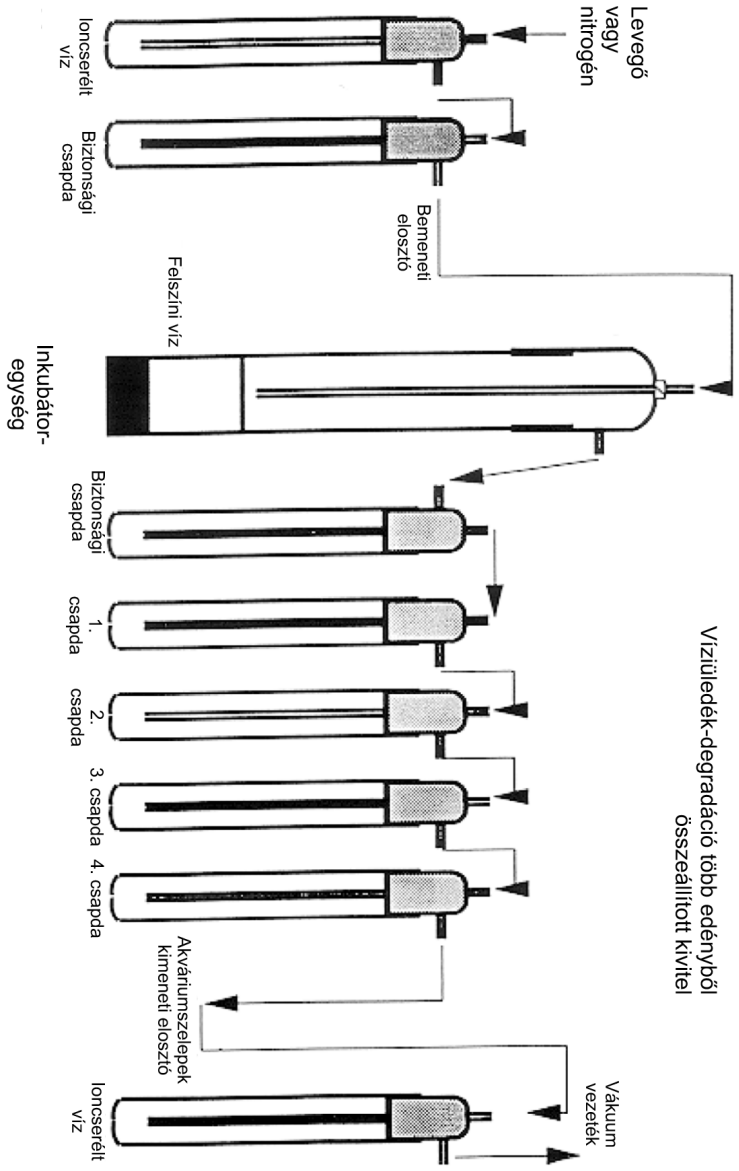
Az anaerob vizsgálati rendszernél a vizsgálati eljárás lényegében megegyezik az anaerob rendszernél vázolttal, azzal a különbséggel, hogy itt minden inkubációs egységen nedvesített nitrogént vezetnek át a víz felszíne felett, hogy nitro géngázteret tartsanak fenn. Ha a redoxpotenciál (E_h) - 100 mV-nál alacsonyabb, akkor az üledék és a víz is anaerobnak tekinthető.

Az anaerob vizsgálatban, a mineralizació vizsgálata magában foglalja a képződött szén-dioxid és metán mérését is.

▼B

2. függelék

PÉLDA EGY GÁZÁTVEZETÉSES KÉSZÜLÉKRE

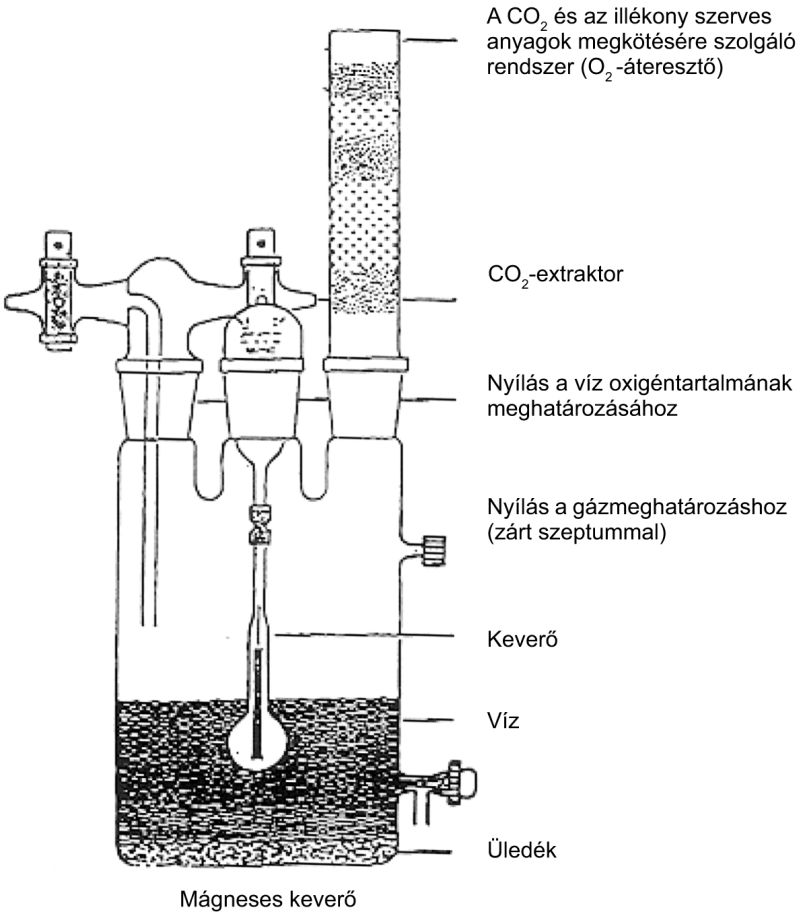


Biztonsági csapda, üres
1. csapda:
etilén-glikol az illékony szerves anyagok megkötésére
2. csapda:
0,1 M kénsav a lúgos illékony anyagok megkötésére
3. és 4. csapda
2 M nátrium-hidroxid a CO_2 és más savas illékony anyagok megkötésére

▼B

3. függelék

PÉLDA EGY BIOMÉTER-KÉSZÜLÉKRE



▼B

4. függelék

MINTASZÁMÍTÁS A TESZTEDÉNYBEN ALKALMAZANDÓ DÓZISHOZ

A henger belső átmérője:	= 8 cm
Vízoszlopmélység az üledék nélkül:	= 12 cm
Vízfelszín nagysága: 3,142 × 4^2	= 50,3 cm^2
Alkalmazási arány: 500 g vizsgálandó anyag/ha 5 µg/cm^2-nek felel meg	
Teljes µg: 5 × 50,3	= 251,5 µg
A mennyiség korrigálása a 100 cm-es mélységre: 12 × 251,5 + 100	= 30,18 µg
A vízoszlop térfogata: 50,3 × 12	= 603 ml
Koncentráció a vízben: 30,18 × 603	= 0,050 µg/ml vagy 50 µg/l

▼M1

C.25. AEROB MINERALIZÁCIÓ FELSZÍNI VIZEKBEN – VIZSGÁLAT A BIOLÓGIAI LEBONTÁS SZIMULÁLÁSÁRA

1. MÓDSZER

Ez a módszer megegyezik az OECD TG 309 (2004) (1) jelű módszerrel.

1.1. BEVEZETÉS

A vizsgálat célja az aerob természetes vízben, kis koncentrációban jelenlévő vizsgálati anyag biológiai lebontása időtartamának meghatározása, és a megfigyelések reakciókinetikai kifejezések szerinti számszerűsítése. Maga a szimuláció egy laboratóriumi, rázó-lombikos egymenetes vizsgálat, amelynek a segítségével természetes felszíni vizek (édes-, brakk- vagy tengervíz) mintáiban jelen lévő szerves anyagok aerob biológiai lebontásának sebessége megadható. A módszer alapja az ISO/DIS 14592–1 (2), de magában hordozza a C.23 és a C.24 (3)(4) módszerek egyes elemeit is. Lehetőség van arra, hogy hosszú vizsgálati idő esetén az egymenetes működtetést félfolyamatos működtetésre változtassuk a vizsgálati mikrokozmosz romlásának megelőzése céljából. A szimulációs vizsgálat alapvető célja a felszíni vízben jelen lévő vizsgálni kívánt anyag mineralizációjának meghatározása, ahol a mineralizáció a lebontás kinetikája kifejezésének az alapját képezi. Emellett azonban a vizsgálat másodlagos célja, hogy információt szolgáltasson az elsődleges lebontásról és a keletkező fő transzformációs termékekről. Ez utóbbiak azonosítása, és amennyiben lehetséges, koncentrációjuk számszerűsítése a nagyon lassan mineralizálódó anyagok (pl. ha a teljes maradvány ^{14}C izotóp felezési ideje meghaladja a 60 napot) esetében különösen fontos. Az analitikai megkötésekből következően a fő transzformációs termék azonosításához és mennyiségi meghatározásához a vizsgálati anyagot jellemzően magasabb koncentrációban (pl. > 100 μg/l) kell alkalmazni.

Ebben a vizsgálatban alacsony koncentráció alatt olyan koncentrációértéket értünk (pl. kisebb mint 1–100 μg/l), amely elég alacsony ahhoz, hogy biztosítsa azt, hogy a vizsgálatban kapott biológiai lebontási kinetika jól tükrözze a környezetben várható kinetikát. A vizsgálathoz használt természetes vízben található biológiailag lebontható szén szubsztrátok teljes mennyiségéhez képest a vizsgálati anyag csak kis koncentrációban van jelen, és csak másodlagos szubsztrátként fog szolgálni. Ez maga után vonja, hogy a várható biológiai lebontási kinetika elsőrendű (nem-növekedési kinetika), és hogy a vizsgálati anyag lebontása kometabolizmussal történhet. A kinetika elsőrendűségéből következik, hogy a lebontás sebessége (mg/l/nap) arányos a szubsztrát koncentrációjával, amelynek értéke az időben folyamatosan csökken. A valódi elsőrendű kinetikában a specifikus lebontási sebességi állandó, a k, független az időtől és a koncentrációtól. Vagyis k értéke nem változik jelentősen egy kísérlet során, és a különböző kísérletekben éppen alkalmazott vizsgálati anyag koncentrációjának hatására sem. Lényegében a specifikus lebontási sebességi állandó értéke megegyezik a koncentráció időegységenkénti relatív változásával: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Bár rendesen az előírt kritériumok teljesülése mellett az elsőrendű kinetika várható, lehetnek bizonyos körülmények, amelyek között más kinetikák megfelelőbbek. Az elsőrendű kinetikától való eltérést tapasztalhatunk, ha tömegátviteli jelenség, például a diffúziósebesség határozza meg a biotranszformáció sebességét, és nem a biológiai reakció sebessége. Ezek az adatok azonban majdnem mindig leírhatóak pszeudo-elsőrendű kinetikával, ha bevezetünk egy koncentrációfüggő sebességi állandót is.

▼M1

A kísérletek megtervezését és a kapott eredmények értelmezését megkönnyíti, ha a vizsgálat megkezdése előtt megfelelő információk (pl. szabványos szűrővizsgálatokból) állnak rendelkezésre a nagy koncentrációjú vizsgálati anyag biológiai lebonthatóságáról, valamint abiotikus lebontásáról, a transzformációs termékekről és vonatkozó fizikokémiai tulajdonságaikról. A teljes biológiai lebontás mértékének meghatározását a ^{14}C-jelölt vizsgálati anyag alkalmazása, és annak a vizsgálat végén kapott fázismegoszlása teszi lehetővé. Jelöletlen vizsgálati anyag alkalmazása esetén a teljes biológiai lebontás mértékének megállapítása csak akkor lehetséges, ha a vizsgálati anyag koncentrációja magas és a fő transzformációs termékek ismertek.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Elsődleges biológiai lebontás: Egy kémiai anyagban a mikroorganizmusok által létrehozott szerkezeti változás (transzformáció), amely a kémiai azonosság elvesztésével jár.

Funkcionális biológiai lebontás: Egy kémiai anyagban a mikroorganizmusok által létrehozott szerkezeti változás (transzformáció), amely a kiindulási anyag egy specifikus tulajdonságának elvesztésével jár.

Teljes aerob biológiai lebontás: Egy kémiai anyag oxigén jelenlétében történő, mikroorganizmusok általi lebontása szén-dioxiddá, vízzé és a jelen lévő bármely más elem ásványi sóivá (mineralizáció), valamint új biomassza és szerves mikrobiális bioszintézistermékek létrehozása.

Mineralizáció: Egy vegyi vagy szerves anyag oxigén jelenlétében történő, mikroorganizmusok általi lebontása szén-dioxiddá, vízzé és a jelen lévő bármely más elem ásványi sóivá.

Lappangási fázis: A vizsgálat kezdetétől addig eltelt idő, amíg a lebontást végző mikrobák adaptációja megtörténik, és a vegyi anyag vagy a szerves anyag biológiai lebontásának mértéke a detektálható szint fölé emelkedik (pl. a legmagasabb elméleti biológiai lebontás 10 %-a, vagy ennél kisebb érték a mérési módszer pontosságától függően)

A legmagasabb biológiai lebontási szint: A vizsgált vegyi vagy szerves anyag biológiai lebontásának mértéke százalékban, amely felett további biológiai lebontás a vizsgálat folyamán már nem történik.

Elsődleges szubsztrát: A természetes szén- és energiaforrások összessége, amely a mikrobiális biomassza növekedésére és fenntartására fordítódik.

Másodlagos szubsztrát: Egy olyan, kis koncentrációban jelen lévő szubsztrátkomponens, amelynek a lebontása csak elhanyagolhatóan kis szén- és energiaforrást jelent az érintett mikroorganizmus számára, a fő komponensek (elsődleges szubsztrát) lebontásával szolgáltatott szén- és energiaforráshoz viszonyítva.

Lebontási sebességi állandó: Egy elsőrendű, vagy pszeudo-elsőrendű kinetikus sebességi állandó, k (nap^{-1}), ami a lebontási folyamatok sebességét jelzi. Egymenetes kísérletben k a lappangási fázis vége után nyert lebontási görbe kezdeti szakaszából következtethető.

▼M1

Felezési idő, $t_{1/2}$ (nap): Az elsőrendű reakció sebességének leírására használt kifejezés. A koncentráció felére csökkenéséhez szükséges időintervallum. A felezési idő és a lebontási sebességi állandó a $t_{1/2} = \ln 2/k$ egyenlet szerint aránylik egymáshoz.

Lebontásos felezési idő, DT_{50} (nap): A biológiai lebontási vizsgálat eredményének számszerűsítésére használt kifejezés. Az a lappangási fázist is tartalmazó időintervallum, amely az 50 %-os biológiai lebontási érték eléréséhez szükséges.

Mennyiségi meghatározás határa (LOD) és a mérhetőségi határ (LOQ): A mennyiségi meghatározás határa (LOD) az adott anyagnak az a koncentrációja, amely alatt az anyag egyértelmű azonosításához szükséges jel nem különböztethető meg az analitika háttérzajától. A mérhetőségi határ (LOQ) az adott anyagnak az a koncentrációja, amely alatt a koncentráció nem határozható meg elfogadható pontossággal.

Oldott szerves széntartalom (DOC): A vízminta szerves széntartalmának az a része, amely nem távolítható el meghatározott fázis szétválasztással (pl. 15 percig tartó 40 000 ms^{-2}-es centrifugálással vagy 0,2 – 0,45 μm pórusátmérőjű membránon keresztül történő szűréssel).

Teljes szerves ^{14}C aktivitás (TOA): A szerves széntartalomhoz tartozó teljes ^{14}C aktivitás.

Oldott szerves ^{14}C aktivitás (DOA): Az oldott szerves széntartalomhoz tartozó teljes ^{14}C aktivitás.

Szemcsés szerves ^{14}C aktivitás (POA): A szemcsés szerves széntartalomhoz tartozó teljes ^{14}C aktivitás.

1.3. A VIZSGÁLAT ALKALMAZHATÓSÁGA

Ez a szimulációs vizsgálat kis koncentrációban alkalmazott nem illékony, vagy kis mértékben illékony szerves anyagok vizsgálatára alkalmas. A légkör felé nyitott (pl. vattadugóval lezárt) lombikok alkalmazása mellett a gyakorlatban az 1 Pa•m^3/mol-nál (kb. 10^{-5} atm•m^3/mol) kisebb Henry-állandójú anyagok tekinthetők nem illékonynak. A gőztérrel rendelkező zárt lombikok esetében a kis mértékben illékony anyagok (Henry-állandójuk < 100 Pa•m^3/mol vagy < 10^{-3} atm•m^3/mol) is vizsgálhatóak anélkül, hogy anyagveszteség lépne fel. A megfelelő óvintézkedések elhagyása esetén a ^{14}C-jelölt anyag elvesztése léphet fel, amikor a CO_2 eltávozik a rendszerből. Ilyen esetekben szükséges lehet a CO_2 visszatartása egy belső lúg abszorbenssel, vagy egy külső abszorbens rendszerrel (direkt $^{14}CO_2$ meghatározás; lásd 3. melléklet). A biológiai lebontási kinetika meghatározásához a vizsgálati anyag koncentrációjának kisebbnek kell lennie a vízben való oldhatósági határánál. Meg kell jegyezni azonban, hogy a vízben való oldhatóság szakirodalmi értékei jelentősen magasabbak lehetnek, mint a vizsgálati anyag természetes vízben való oldhatósága. Lehetőség van arra is, hogy a vízben különösen gyengén oldódó vizsgálati anyagok oldhatóságát megállapítsuk a vizsgált természetes vizek alkalmazásával.

A biológiai lebontást szimuláló módszer használható mind durva részecskéktől mentes víz („nyílt vízi vizsgálat”), mind pedig olyan zavaros felszíni vizek esetében, amelyek pl. a víz/üledék határfelülethez közel fordulhatnak elő („lebegő-üledék vizsgálat”).

▼M1

1.4. A VIZSGÁLAT ALAPELVE

A vizsgálatot egy adagban hajtják végre, vagy csak felszíni vízben inkubálva a vizsgálati anyagot („nyílt vízi vizsgálat”), vagy 0,01–1 g/l száraztömegű lebegő szilárd anyaggal/üledékkel kiegészített felszíni vízben inkubálva a vizsgálati anyagot (lebegő üledék vizsgálat). Ez utóbbi módszer szimulálja a lebegő szilárd anyagot vagy felkavart üledéket tartalmazó víztestet. A lebegő szilárd anyag/üledék ilyen koncentráció-intervallumának alsó tartománya jellemző a legtöbb felszíni vízre. A vizsgálati lombikok inkubálása aerob körülmények között, rázatva, környezeti hőmérsékleten, sötétben történik. A lebontásos kinetika meghatározásához legalább két különböző vizsgálatianyag-koncentráció alkalmazása szükséges. A koncentrációknak ötös-tizes szorzófaktorral kell eltérniük egymástól, és a környezetben várható koncentrációtartományt kell mutatniuk. A vizsgálati anyag maximális koncentrációja nem lépheti túl a 100 μg/l–t, de 10 μg/l alatti, vagy még kisebb tesztkoncentrációkat részesítenek előnyben annak biztosításához, hogy a biológiai lebontás valóban elsőrendű kinetikát kövessen. A minimális koncentráció nem lehet több 10 μg/l-nél, de az 1–2 μg/l, vagy az 1 μg/l-nél kisebb a legelőnyösebb. Normál esetben az ilyen alacsony koncentrációk megfelelő analízise a kereskedelmi forgalomból beszerezhető ^{14}C-jelzett anyagokkal elvégezhető. Az analitikai módszer korlátjai miatt gyakran lehetetlen a vizsgálati anyag koncentrációjának kívánt pontosságú mérése abban az esetben, ha a vizsgálati anyag bemérési koncentrációja ≤ 100 μg/l (lásd az 1.7.2. pont második bekezdését). A fő transzformációs termék azonosításához és mennyiségi meghatározásához, illetve ha nem áll rendelkezésre alacsony mennyiségi meghatározási határral bíró specifikus analitikai módszer, a vizsgálati anyag magas koncentrációban is alkalmazható (> 100 μg/l és néha > 1 mg/l). Ilyen esetekben a kapott eredmények nem használhatóak az elsőrendű lebontási sebességi állandó és a felezési idő számításához, hiszen a lebontás valószínűleg nem elsőrendű kinetikát követ.

A lebontás nyomon követése megfelelő időpontokban mért maradó ^{14}C koncentráció mérésével, vagy specifikus kémiai vizsgálat használata esetén a vizsgálati anyag maradvány koncentrációjának mérésével történik. A molekula legstabilabb részének ^{14}C-jelölése biztosítja a teljes mineralizáció értékének meghatározását, míg a molekula kevésbé stabil részének jelölése, valamint a specifikus vizsgálat használata teszi lehetővé az elsődleges biológiai lebontás mértékének becslését. Mindamellett a legstabilabb rész nem feltétlenül foglalja magában a molekula vonatkozó funkciós csoportját (ami egy speciális tulajdonsággal, pl. toxicitással, bioakkumulációval stb. lehet kapcsolatos). Ebben az esetben célszerű lehet olyan vizsgálati anyag alkalmazása, amely a funkcionális részen ^{14}C-jelölt, hogy az adott tulajdonság megszűnése követhetővé váljon.

1.5. INFORMÁECIÓK A VIZSGÁLATI ANYAGRÓL

Radioaktívan jelölt és nem jelölt anyagok egyaránt használhatóak a vizsgálat során. Ajánlott a ^{14}C-jelöléses technika. A jelölésnek normál esetben a molekula legstabilabb részét kell érintenie (lásd az 1.4. szakaszt is). Egynél több aromás gyűrűt tartalmazó anyagok esetében célszerű minden gyűrű egy vagy több szénatomjának ^{14}C-jelölése. Emellett javasolt a kapcsolódó, könnyen lebontható csoportok mindkét oldalán egy vagy több szénatom jelölése is. A vizsgálati anyag kémiai és/vagy radiokémiai tisztaságának > 95 %-nak kell lennie. Radioaktívan jelölt anyagok esetében javasolt a kb. 50 μCi/mg (1,85 MBq), vagy még nagyobb specifikus aktivitás, ami megkönnyíti a ^{14}C mérést a kis kezdeti koncentrációjú vizsgálatokban. A vizsgálati anyagokról az alábbi információkkal kell rendelkezni:

▼M1

— vízben való oldhatóság [A.6. módszer],

— szerves oldószer(ek)ben való oldhatóság (oldószerrel együtt alkalmazott, vagy vízben rosszul oldódó anyagok),

— disszociációs állandó (pKa), amennyiben az anyag hajlamos a protonálódásra, illetve deprotonálódásra [OECD TG 112] (5),

— gőznyomás [A.4 módszer] és Henry-állandó,

— kémiai stabilitás vízben és sötétben (hidrolízis) [C.7. módszer].

Amennyiben vízben rosszul oldódó anyagot vizsgálunk tengervízben, hasznos tudni a kisózási állandót (vagy „Setschenow-állandót”) K^s, amely a $\log (S/S') = K^s C_m$ egyenletből fejezhető ki, ahol S és S' az anyag oldhatósága édes-, illetve tengervízben és C_m a moláris sókoncentráció értéke.

Ha a vizsgálatokat „lebegő üledék vizsgálatként” végezzük el, az alábbi információkkal kell rendelkezni:

— n-oktanol/víz megoszlási együttható [A.8. módszer],

— adszorpciós együttható [C.18. módszer].

További fontos adatok lehetnek:

— a vizsgálati anyag környezeti koncentrációja, ha ez ismert, vagy becsült,

— a vizsgálati anyag mikroorganizmusokra gyakorolt toxicitása [C.11. módszer],

— gyors és/vagy inherens lebonthatóságáról [C.4 A–F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5) módszerek],

— aerob vagy anaerob lebonthatóság a talaj és üledék/víz transzformációs kísérletekben [C.23., C.24. módszer].

1.6. REFERENCIAANYAG

Referenciaanyagként célszerű egy aerob körülmények között könnyen lebontható anyagot (pl. anilin, vagy nátrium-benzoát) használni. Az anilin és nátrium-benzoát lebontásának várható időtartama rendszerint kevesebb mint 2 hét. A referenciaanyag használatával megbizonyosodhatunk arról, hogy a mikrobiális aktivitás a tesztvízben bizonyos határokon belül mozog, azaz, hogy a vízminta tartalmazz aktív mikrobiális populációt.

▼M1

1.7. MINŐSÉGI KRITÉRIUMOK

1.7.1. **Visszanyerés (recovery)**

Közvetlenül a vizsgálati anyag hozzáadása után minden egyes kiindulási vizsgálati koncentrációt ^{14}C aktivitásméréssel, vagy nem jelölt anyag esetén kémiai analízissel ellenőrizni kell legalább ellenmintában. Ez információval szolgál az analitikai módszer alkalmazhatóságáról és ismételhetőségéről, valamint a vizsgálati anyag eloszlásának homogenitásáról. A későbbi adatkiértékelések során célszerű a kezdeti ^{14}C aktivitás, vagy vizsgálatianyag-koncentráció adattal számolni a névleges koncentráció helyett, hiszen a szorpció miatti veszteségek és az adagolási hibák ezáltal kompenzálhatóak. ^{14}C-jelölt vizsgálati anyag esetében a kísérlet végén történő visszanyerés értékét tömegkiegyenlítéssel adják meg (lásd 1.8.9.4. pont utolsó bekezdése). Ideális esetben a radioaktívan jelölt izotóp tömegkiegyenlítése 90 és 110 % közötti tartományban mozog, míg a nem jelölt vizsgálati anyag esetében a pontos analitikának 70–110 % közötti kezdeti visszanyerést kell eredményeznie. Ezeket a számokat mint elérendő céltartományokat, és nem mint a vizsgálat elfogadhatósági kritériumait kell kezelni. Az analízis megbízhatóságát választhatóan a kiindulásinál kisebb vizsgálatianyag-koncentrációra, vagy a fő transzformációs termékekre is meg lehet határozni.

1.7.2. **Az analitikai módszer ismételhetősége és érzékenysége**

A vizsgálati anyag és a transzformációs termékek mennyiségi meghatározásához az analitikai módszer ismételhetőségét (a kiindulási kivonás hatékonyságát is beleértve), amennyiben szükséges, a felszíni vízminta 5 független kivonatának analízisével kell ellenőrizni.

Az analitikai módszernek a vizsgálati anyagra és a transzformációs termékekre vonatkozó mennyiségi meghatározási határa (LOD) a tesztrendszerben alkalmazott kiindulási mennyiség legalább 1 %-a legyen. A mérhetőségi határnak (LOQ) az alkalmazott koncentráció 10 %-ával egyenlőnek, vagy annál kevesebbnek kell lennie. Számos szerves anyag és transzformációs termékeik kémiai analízise gyakran megkívánja a vizsgálati anyag viszonylag magas koncentrációjának (azaz > 100 μg/l) alkalmazását.

1.8. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.8.1. **Eszközök**

A vizsgálatok megfelelő térfogatú (pl. 0,5 vagy 1,0 literes), szilikon-, vagy gumidugóval lezárt kúp, vagy henger alakú lombikokban, illetve CO_2-biztos tetővel (pl. butilgumi-szeptum) ellátott szérumlombikokban végezhetőek. A vizsgálat megvalósításának másik módja, ha nagyszámú lombikot használunk és minden mintavételi időpontban legalább kétszer feldolgozzuk a lombikok teljes tartalmát (lásd az 1.8.9.1. pont utolsó bekezdését). Radioaktívan nem jelölt, nem illékony vizsgálati anyagok esetében gázbiztos dugók vagy fedelek nem szükségesek, a kívülről történő beszennyeződéstől megóvó laza vattadugók megfelelőek (lásd az 1.8.9.1. pont második bekezdését). A kis mértékben illékony anyagok tesztelését biométertípusú rendszerekben végezhetjük, a vízfázis óvatos kevertetése mellett. A felhasználásukat megelőzően hővel vagy autoklávozással a laboreszközök sterilizálhatóak, így a bakteriális beszennyeződésük kizárható. Ezek mellett az alábbi általános laboreszközök kerülnek felhasználásra:

— rázógép vagy mágneses keverő a tesztlombikok folyamatos kevertetéséhez,

▼M1

— centrifuga,

— pH mérő,

— turbiditásmérő a zavarosság mértékének meghatározására,

— hevítőkemence vagy mikrohullámú sütő a száraz tömeg meghatározására,

— membránszűrő apparátus,

— autokláv vagy hőlégsterilizáló az üvegeszközök sterilizálásához,

— ^{14}C-jelölt anyagokkal végzett munkához szükséges felszerelés,

— műszer a ^{14}C-activitás megkötött CO_2-t tartalmazó oldatmintákból, vagy szükség esetén üledékmintákból történő mennyiségi meghatározásához,

— specifikus kémiai analízis alkalmazása esetén a vizsgálati anyag (és a referenciaanyag) méréséhez szükséges analitikai berendezés (pl. gázkromatográf, nagynyomású folyadékkromatográf).

1.8.2. **A vizsgálati anyag törzsoldatai**

A vizsgálat- és referenciaanyag törzsoldatainak elkészítéséhez ioncserélt vizet használunk (lásd az 1.8.7. pont első bekezdését). Az ioncserélt víznek a mikroorganizmusokra toxikus anyagoktól mentesnek kell lennie, és oldott szerves széntartalma (DOC) nem lehet több 1 mg/l-nél (6).

1.8.3. **A felszíni vízminta begyűjtése és szállítása**

A felszíni vízminta vételére szolgáló mintavételi helyet mindenkor a vizsgálat céljainak megfelelően kell kiválasztani. A mintavételi hely kiválasztásakor figyelembe kell venni a mezőgazdasági, az ipari és a háztartási eredetű korábbi hatásokat. Amennyiben ismeretes, hogy az elmúlt négy évben a vízbázis a vizsgálati anyaggal, vagy annak szerkezeti analógjaival szennyeződött, akkor tesztvíz vételére nem használható, hacsak a vizsgálatot végzőnek nem kifejezetten az a célja, hogy korábban szennyezett területen vizsgálja a lebontási sebességét. A víz pH-ját és hőmérsékletét a mintavételi helyszínen kell megmérni. Továbbá fel kell jegyezni a mintavétel mélységét és a vízminta állagát is (szín és zavarosság) (lásd 3. pont). Az aerob körülmények jelenlétének bizonyításához – hacsak ez már a területen végzett előző kísérletek és azok eredményei alapján, valamint a külső megjelenés alapján nyilvánvalóan el nem dönthető – a víz és az üledék felszíni rétege oxigén-koncentrációjának és/vagy redoxpotenciáljának mérése is szükséges. A felszíni vizet alaposan kitisztított edényben szállítsuk. A szállítás során a minta hőmérséklete jelentősen nem haladhatja meg a vizsgálat hőmérsékletét. Ha a szállítás 2–3 óránál hosszabb időt vesz igénybe, a mintát ajánlatos 4 °C-ra hűteni. A vízminta fagyasztása tilos.

▼M1

1.8.4. **A felszíni vízminta tárolása és előkészítése**

A vizsgálatot célszerű a mintavételt követő egy napon belül elvégezni. Ha szükséges a minta tárolása, a tárolás időtartamát minimalizálni kell, és semmilyen körülmények között sem szabad 4 hétnél tovább tárolni. A felhasználásig a vízmintát levegőztetés mellett tartsuk 4 °C-on. A felhasználás előtt távolítsuk el a durva részecskéket (pl. kb. 100 μm pórusméretű nylon szűrőn vagy durva szűrőpapíron történő átszűréssel, vagy ülepítéssel).

1.8.5. **Üledékkel kiegészített vízminta előkészítése (választható)**

A lebegőüledékes iszap vizsgálathoz (a durva részecskéktől az 1.8.4. pontban leírtak szerint szűréssel megszabadított) természetes vízmintát tartalmazó lombikokba juttassunk felszíni üledéket, hogy szuszpenziót kapjunk. A lebegő szilárd anyag koncentrációjának 0,01 és 1 g/l közöttinek kell lennie. A felszíni üledéknek a vízminta kivételi helyéről kell származnia. A vízbázis adott környezetétől függően a felszíni üledék lehet nagy szervesszén-tartalmú (2,5–7,5 %) és finom szerkezetű, vagy kis szervesszén-tartalmú (0,5–2,5 %) és durva szerkezetű (3). A felszíni üledék előkészítésekor átlátszó műanyagcső segítségével emeljünk ki több üledékdarabot, a mintavétel után azonnal vágjuk le a felső aerob réteget (a felszíntől max. 5 mm-es mélységig), és egyesítsük ezeket. Az így kapott üledéket nagy légterű edényben kell szállítani, hogy az üledék aerob körülmények között maradjon (ha a szállítási idő 2–3 óránál több, hűtsük 4 °C-ra). Az üledékmintából 10-szeres mennyiségű vízzel készítsünk szuszpenziót, és a felhasználásig levegőztetés mellett 4 °C-on tartsuk. Ha szükséges az üledék tárolása, a tárolás időtartamát minimalizálni kell, és semmilyen körülmények között sem szabad 4 hétnél tovább tárolni.

1.8.6. **Félfolyamatos eljárás (opcionális)**

Ha hosszú várakozási időnek kell eltelnie azelőtt, hogy a vizsgálati anyag szignifikáns mértékű lebontását lehetne mérni, akkor hosszabb inkubációra (több hónap) lehet szükség. Ha ez az anyag korábbi vizsgálatai alapján ismert, akkor a vizsgálat félfolyamatos eljárással kezdhető, ami lehetővé teszi a tesztvíz vagy szuszpenzió egy részének időről időre történő kicserélését (lásd 2. melléklet). Másik megoldásként a szokásos egymenetes vizsgálat átalakítható félfolyamatos vizsgálattá, ha a vizsgálati anyagnál az egymenetes eljárással körülbelül 60 nap alatt sem tapasztalunk lebontást (lásd az 1.8.8.3. pont második bekezdése).

1.8.7. **A vizsgálati anyag (vagy referenciaanyag) bejuttatása a rendszerbe**

A vízben jól oldódó (> 1 mg/l) és kis illékonyságú (Henry-állandó < 1 $Pa•m^3$/mól vagy < 10^{-5} $atm•m^3$/mól) anyagokból ioncserélt vízzel (lásd 1.8.2. pont) törzsoldat készíthető. Ebből megfelelő mennyiséget a tesztedényekbe juttatva beállíthatjuk a kívánt koncentrációkat. A hozzáadott törzsoldat térfogatát a gyakorlatilag lehetséges minimum szinten kell tartani (ha lehetséges, a végső folyadéktérfogat 10 %-a alatt). Egy másik lehetséges módszer a vizsgálati anyag feloldása nagyobb térfogatú tesztvízben, ami a szerves oldószer használatának alternatívájaként tekinthető.

▼M1

Ha ez elkerülhetetlen, a vízben rosszul oldódó nem illékony anyagok törzsoldatait illékony szerves oldószer felhasználásával is előállíthatjuk, de a tesztrendszerbe juttatott oldószer mennyisége nem lépheti túl az 1 tf %-ot, és nem lehet káros hatása a mikrobás aktivitásra, vagy a vizsgálati anyag stabilitására a vizes oldatban. Az oldószert annyira ki kell űzni az oldatból, hogy lehetőleg csak nagyon kis mennyiségben maradjon, ami már jelentős mértékben nem emeli a tesztvíz vagy szuszpenzió DOC koncentrációját. Ezt anyagspecifikus analízissel, vagy ha lehetséges DOC analízissel kell ellenőrizni (6). Figyelmet kell fordítani arra, hogy a bejuttatott oldószer mennyiségét az abszolút szükséges mennyiségre korlátozzuk, és biztosítani kell, hogy a vizsgálati anyag feloldódhasson a tesztvíz végleges térfogatában. A vizsgálati anyagnak a reakcióedényekbe történő bejuttatására szolgáló más módszereket a (7) és (8) referencia tartalmazza. Abban az esetben, ha a vizsgálati anyaghoz szerves oldószert adunk, tesztvizes (más adalék nélküli) oldószer-kontrollt és referencia szubsztrát-kontrollt is alkalmazni kell. Ez utóbbit hasonlóan kezeljük, mint a vivőoldószerben oldott vizsgálati anyaggal kiegészített aktív tesztedényeket. Az oldószer-kontrollok célja, hogy megvizsgáljuk a szolvens által okozott, a mikrobapopulációra gyakorolt lehetséges gátló hatást, amit a referenciaanyag lebontási kinetikája jelez előre.

1.8.8. **Tesztkörülmények**

1.8.8.1. *Teszthőmérséklet*

Az inkubációnak sötétben vagy szórt fényben, kontrollált hőmérsékleten (± 2 °C) kell történnie, amely lehet terepi hőmérséklet vagy 20–25 °C-os szobahőmérséklet. A terepi hőmérséklet a minta mintavételkor mért tényleges hőmérséklete, vagy a mintavételi hely átlagos terepi hőmérséklete.

1.8.8.2. *Kevertetés*

A kevertetés a folyamatos rázatás vagy keverés révén gondoskodik a részecskék és a mikrobák szuszpenzióban tartásáról. A kevertetés elősegíti a gáztérből az oxigén bejutását a folyadékfázisba, ezáltal az aerob körülmények megfelelő módon fenntarthatóak. Helyezzük a lombikokat a rázógépbe (kb. 100 rpm-es kevertetés) vagy használjunk mágneses keverőt. A kevertetésnek folyamatosnak kell lennie. Mindazonáltal a rázatásnak vagy a keverésnek a homogén szuszpenzió fenntartása mellett a lehető legenyhébbnek kell lennie.

1.8.8.3. *A vizsgálat időtartama*

A vizsgálat időtartama általános esetben nem lépi túl a 60 napot, hacsak a félfolyamatos eljárás szerint a vizsgálati szuszpenziót időről időre nem cseréljük (lásd a 1.8.6. pontot és a 2. mellékletet). Az egymenetes vizsgálati periódus is kiterjeszthető azonban maximum 90 napra, ha a vizsgálati anyag lebontása az első 60 napon belül megkezdődött. A lebontás rendszeres időközönkénti nyomon követése a visszamaradó ^{14}C aktivitás, vagy a kibocsátott $^{14}CO_2$ (lásd 1.8.9.4. pont) mérésével és/vagy a kémiai analízissel (lásd 1.8.9.5. pont) történik. A lebontási folyamat értékelhetőségéhez az inkubációs időnek megfelelően hosszúnak kell lennie. A lebontás mértékének lehetőleg 50 % felett kell lennie, lassan bomló anyagoknál a lebontás mértékének megfelelőnek (normális esetben 20 % feletti lebontás) kell lennie ahhoz, hogy biztosítsa a kinetikus lebontásos sebességi állandó becsülhetőségét.

▼M1

A vizsgálati rendszerben a pH-t és az oxigénkoncentrációt rendszeresen mérni kell, hacsak az ugyanarról a területről származó víz- és üledékmintákkal végzett hasonló vizsgálatokból leszűrhető tapasztalatok ezt szükségtelenné nem teszik. Bizonyos körülmények között a vízben vagy üledékben sokkal nagyobb koncentrációban jelen lévő elsődleges szubsztrátok metabolizmusa elegendő CO_2-termelődést és oxigénfogyást eredményez ahhoz, hogy a vizsgálat során a kísérleti körülmények jelentősen megváltozzanak.

1.8.9. **Kísérleti eljárás**

1.8.9.1. *A lombikok előkészítése nyílt vízi vizsgálathoz*

Juttassunk megfelelő mennyiségű tesztvizet a tesztlombikokba, a lombikokat térfogatuk kb. harmadáig töltve, de legalább kb. 100 ml tesztvizet töltve beléjük. Több lombik használata esetén (ami lehetővé teszi a lombik teljes tartalmának feldolgozását minden mintavételi időpontban) is kb. 100 ml a kívánt tesztvíz-mennyiség, mivel a kis mintatérfogatok hatással lehetnek a lappangási fázis hosszára. A vizsgálati anyag törzsoldatból történő bejuttatása az 1.8.2. és 1.8.7. pontokban leírtak szerint történik. Hogy a lebontási kinetika meghatározása és a kinetikus lebontásos sebességi állandó számíthatóvá váljon, a vizsgálati anyagot legalább két, egymástól ötös-tizes szorzófaktorral eltérő koncentrációban kell használni. Mindegyik választott koncentrációnak 100 μg/l-nél kisebbnek kell lennie, lehetőleg a < 1–10 μg/l tartományban.

Zárjuk le a lombikokat a levegő és CO_2 számára áthatolhatatlan dugókkal vagy fedelekkel. ^{14}C izotóppal nem jelölt nem-illékony vizsgálati anyagok esetében elegendő laza vattadugókat használni a légkörből érkező szennyezések elkerülésére (lásd 1.8.1. pont), feltéve hogy az összes fő transzformációs termék ismerten nem illékony, és indirekt CO_2 meghatározást (lásd 3. melléklet) alkalmazunk.

Inkubáljuk a lombikokat a választott hőmérsékleten (lásd 1.8.8.1. pont). Különítsünk el mintákat a kémiai analízishez vagy a ^{14}C méréshez a vizsgálat kezdetén (azaz mielőtt a biológiai lebontás megindulna; 1.7.1. pont), majd végig a vizsgálat folyamán megfelelő időközönként. A mintavétel történhet úgy, hogy minden párhuzamosból kis mennyiségű mintát (pl. 5 ml-es alikvótok) veszünk, vagy minden egyes mintavételi időpontban feldolgozhatjuk teljes lombikok tartalmát. A vizsgálati anyag mineralizációját meghatározhatjuk indirekt és direkt módon is (lásd 3. melléklet). A sebességi állandó megbízható becsléséhez általában legalább öt mintavételi pont szükséges a lebontási fázisban (azaz a lappangási fázist követően), hacsak nem igazolható, hogy három mérési pont elégséges a gyorsan bomló anyagok esetében. Lassan bomló anyagoknál a lebontásos fázisban több mérés is könnyen kivitelezhető, ennek következtében a k számításához több adatpontot használhatunk. Mivel a biológiai lebontás sebessége eltérő, egy fix mintavételi ütemterv nem határozható meg, bár ha a lebontás lassú heti egy mintavétel elvégzése ajánlatos. Ha a vizsgálati anyag lebontása gyors, az első három napban napi egy mintát, majd ezt követően két-háromnaponta egy mintát kell venni. Bizonyos körülmények között (például gyorsan hidrolizáló anyagok esetében) óránkénti mintavételre is szükség lehet. A vizsgálat megkezdése előtt ajánlott elővizsgálatok lefolytatása a mintavételi intervallumok meghatározására. Ha a mintákat további specifikus analízisnek is alá kell vetni, akkor tanácsos több mintát venni, majd az analizálandókat a kísérlet végén, a visszafelé mérés stratégiáját alkalmazva (azaz az utoljára levett mintákat analizáljuk először) kiválasztani (a minták tárolás közbeni stabilitására vonatkozó útmutatót lásd az 1.8.9.5. pont második bekezdésében).

▼M1

1.8.9.2. *A lombikok és minták száma*

Állítsunk be megfelelő számú tesztlombikot, hogy rendelkezésre álljanak a következők:

— minden egyes vizsgálati anyag-koncentrációhoz legalább két párhuzamos (lehetőleg legalább 3), vagy minden egyes koncentrációhoz számos tesztlombik, ha minden mintavételkor teljes lombikok tartalmának feldolgozása történik (F_T-vel jelölve),

— tesztlombikok az tömegkiegyenlítés-kalkulációhoz legalább két párhuzamosban minden egyes tesztkoncentrációhoz (F_M-mel jelölve),

— vizsgálati anyag nélküli vak kontroll; legalább egy, csak tesztvizet tartalmazó tesztlombik (F_B-mel jelölve),

— referenciakontroll; a referenciaanyagot (pl. anilin vagy nátriumbenzoát) tartalmazó tesztlombikok két párhuzamosban (F_C-vel jelölve). A referenciakontroll célja a mikrobiális aktivitás minimumának ellenőrzése. Ha lehetséges, radioaktívan jelölt referenciaanyag is használható, még akkor is, ha a vizsgálati anyag lebontását kémiai analízissel követjük,

— steril kontroll; egy-két sterilizált tesztvizet tartalmazó lombik az abiotikus lebontás, vagy a vizsgálati anyag más, nem biológiai eredetű elvesztésének vizsgálatához (F_S-sel jelölve). A biológiai aktivitás leállítható a tesztvíz autoklávozásával (121 °C; 20 perc), mérgező anyag hozzáadásával (pl. 10–20 g/l nátrium-azid (NaN_3), 100 mg/l higany-klorid ($HgCl_2$), vagy 100 mg/l formalin), vagy gammasugárzással. $HgCl_2$ használata esetén ezeket mint veszélyes hulladékot kell ártalmatlanítani. Nagy mennyiségben alkalmazott vizes üledékeknél a steril körülményeket nem könnyű kialakítani, ebben az esetben ismételt (pl. háromszori) autoklávozás javasolt. Figyelembe kell venni, hogy az autoklávozás hatására az üledék szorpciós tulajdonságai megváltozhatnak,

— tesztvizet, referenciaanyagot és tesztvizet tartalmazó oldószer kontrollok; azonos mennyiségű oldószerrel és a vizsgálati anyag alkalmazásával megegyező módon előállított lombikok két párhuzamosban. Ennek célja az oldószer esetleges gátló hatásának megállapítása a referenciaanyag lebontásának meghatározásán keresztül.

A vizsgálat megtervezése során a vizsgálatot kivitelező személynek fontolóra kell vennie, hogy számára inkább a nagyobb számú kísérleti ismétlés, vagy ezzel szemben a nagyobb számú mintavétel a fontosabb. A szükséges lombikok pontos száma a lebontás mérésére szolgáló módszertől függ (lásd az 1.8.9.1. pont harmadik bekezdését; az 1.8.9.4. pontot és a 3. mellékletet).

▼M1

Minden mintavételi időpontban minden lombikból két mintát (pl. 5ml-es alikvótokat) kell venni. Ha számos lombik használatos, hogy teljes lombikok tartalmát fel lehessen dolgozni, akkor minden mintavételi időpontban legalább két lombikot kell feláldozni (lásd az 1.8.9.1. pont első bekezdését).

1.8.9.3. *Lombikok előkészítése lebegő üledék vizsgálathoz [választható]*

Ha szükséges, juttassunk megfelelő mennyiségű tesztvizet és üledéket a tesztedényekbe (lásd 1.8.5. pont). A lombikoknak a lebegő üledék vizsgálathoz történő előkészítése megegyezik a nyílt vízi vizsgálatnál leírtakkal (lásd 1.8.9.1. és 1.8.9.2. pontok). Használjunk inkább szérumpalackokat vagy hasonló alakú lombikokat. Helyezzük a lezárt lombikokat vízszintesen a rázógépbe. A nem ^{14}C-jelölt, nem-illékony anyagokat tartalmazó nyitott lombikokat nyilvánvalóan függőlegesen kell elhelyezni, ebben az esetben mágneses keverés, vagy üveggel bevont mágnesrudak használata ajánlott. Ha szükséges, a megfelelő aerob körülmények eléréséhez levegőztessük a reakcióedényeket.

1.8.9.4. *Radiokémai mérések*

A képződő $^{14}CO_2$ mérhető indirekt, vagy direkt módon (lásd 3. melléklet). Az indirekt $^{14}CO_2$ meghatározás a tesztvíz vagy szuszpenzió kezdeti $^{14}CO_2$ aktivitásának, és a mintavétel alkalmával a minta pH 2–3-ra történő lesavanyítása és a CO_2 kiűzése után mért teljes maradó aktivitásnak a különbsége alapján történik. Így a szervetlen széntartalom is távozik, és a maradó aktivitás a szerves anyagtól származik. Ha a vizsgálati anyag átalakulása során illékony fő transzformációs termék képződik, az indirekt $^{14}CO_2$ meghatározás nem használható (lásd 3. melléklet). Amennyiben lehetséges, a $^{14}CO_2$ képződését minden egyes mintavételi pontban legalább egy lombikban direkt módon kell mérni (lásd 3. melléklet). Ez a módszer lehetővé teszi mind az tömegkiegyenlítés, mind a biológiai lebontási folyamat nyomon követését, de használata korlátozott a zárt lombikos vizsgálatok esetében.

Ha a vizsgálat során a termelődő $^{14}CO_2$-t direkt módon mérjük, erre a célra a vizsgálat kezdetekor több lombikot kell beállítani. Ha a vizsgálati anyagból illékony fő transzformációs termék képződik, ez a módszer az ajánlott. A többi tesztlombik tartalmát minden mérési pontban pH 2–3-ra savanyítjuk, és a $^{14}CO_2$-t belső vagy külső abszorbenssel kötjük meg (lásd 3. melléklet).

A ^{14}C-jelölt vizsgálati anyag és a fő transzformációs termék koncentrációját esetleg radiokromatográfiásan (pl. vékonyréteg-kromatográfia, RAD-TLC), vagy radiokémiai detekcióval, HPLC (nagynyomású folyadékkromatográfia) segítségével is meghatározhatjuk.

Opcionálisan a maradó radioaktivitás (lásd 1. melléklet), a vizsgálati anyag és a transzformációs termék fázismegoszlását is meghatározhatjuk.

▼M1

A vizsgálat végén a tömegkiegyenlítést direkt $^{14}CO_2$ méréssel kell megállapítani, olyan független tesztlombikokból, amelyekből a vizsgálat folyamán nem vettünk mintákat (lásd 3. melléklet).

1.8.9.5. *Specifikus kémiai analízis*

Ha lehetőség van érzékeny, specifikus analitikai módszer használatára, az elsődleges biológiai lebontás mértéke az izotópos jelölés helyett a vizsgálati anyag teljes maradó koncentrációjának mérésével állapítható meg. Amennyiben jelölt vizsgálati anyagot használunk (a teljes mineralizáció mérésére), a specifikus kémiai analízis ezzel párhuzamosan elvégezhető, hasznos többlet-információval szolgál, és ellenőrizhetjük vele a módszert. A specifikus kémiai analízis a vizsgálati anyag lebontása során keletkező transzformációs termék mérésére is használható, és ez ajánlott is olyan anyagok esetében, amelyek mineralizációs felezési ideje 60 napnál hosszabb. A vizsgálati anyag és a transzformációs termék koncentrációját minden mintavételi pontban mérni kell és ki kell értékelni (koncentrációban vagy százalékos formában). Általánosságban az alkalmazott koncentráció 10 %-a ≤, bármely mintavételi időpontban kimutatható transzformációs termékeket azonosítani kell, hacsak nincs más értelmű ésszerű indoklás. A kísérlet során folyamatosan emelkedő koncentrációban jelen lévő transzformációs termékek azonosítását is meg kell fontolni, még akkor is, ha ezek nem érik el a fenti határt, mivel ez a lebontással szembeni ellenállóképességet jelezhet. Ha a vizsgálati anyag gyors abiotikus lebontása lehetségesnek tűnik (pl. hidrolízis), akkor fontolóra kell venni a transzformációs termékek analízisét a steril kontrollokban. A transzformációs termékek mennyiségi és minőségi meghatározását az adott esetben kell eldönteni, és az indoklásokkal együtt a kiértékelésben közzétenni. A szerves oldószerrel végzett extrakciós technikákat a megfelelő analitikai módszer előírásai alapján kell elvégezni.

Minden mintát 2 és 4 °C között, légmentesen kell tárolni, ha az analízis 24 órán belül megtörténik (ajánlott). Hosszabb tárolásnál a mintákat – 18 °C alá kell fagyasztani, vagy kémiai módszerrel tartósítani kell. Utóbbi módszerhez a savanyítás nem javasolt, hiszen ezek a minták instabilak lehetnek. Ha a mintákat 24 órán belül nem analizálják és hosszabb tárolásra kerülnek, akkor egy tárolási stabilitás-vizsgálatot kell kapcsolni a kísérlethez, hogy a vizsgált vegyületek kémiai stabilitása – 18 °C alatt vagy tartósított állapotban demonstrálható legyen. Oldószeres extrakciós vagy szilárd fázisú extrakciós (SPE) lépést is magában foglaló analitikai módszereknél az extrakciót azonnal a mintavétel után, vagy a fagyasztott minta maximum 24 óráig tartó tárolása után el kell végezni.

Az analitikai módszer érzékenységének függvényében a pont 16. sorában jelzetteknél nagyobb mintatérfogatok lehetnek szükségesek. A vizsgálat könnyedén kivitelezhető 2–3 literes lombikokban egy literes teszttérfogatokkal, amely lehetővé teszi kb. 100 ml minta levételét.

▼M1

2. **ADATOK ÉS DOKUMENTÁLÁSUK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

2.1.1. **Az adatok ábrázolása**

Kerekítsük a mintavételi időpontokat egész órákra (hacsak az anyag lényeges mértékű lebontása nem percek kérdése), de ne egész napokra. Ábrázoljuk a vizsgálati anyag becsült maradó aktivitását (^{14}C-jelölt anyagok esetében), vagy maradó koncentrációját (nem jelölt anyagok esetében) az idő függvényében mind lineáris, mind fél-logaritmikus skálán (lásd 1a., 1b. ábra). Ha lebontás játszódik le, hasonlítsuk össze az F_T lombikok eredményeit az F_S lombikokéval. Ha a vizsgálati anyagos lombikok (F_T) eredményeinek átlaga kevesebb mint 10 %-kal tér el a steril lombikokétól (F_S), akkor megállapítható, hogy a tapasztalt lebontás alapvetően abiotikus. Amennyiben az F_S lombikokban a lebontás kisebb mértékű, az értékekkel korrigáljuk az F_T lombikoknál kapott értékeket (kivonással), hogy becsülni tudjuk a biológiai lebontás mértékét. Ha a fő transzformációs termékek választható analízisét elvégeztük, akkor ezek keletkezését és fogyását is ábrázolni kell a vizsgálati anyag fogyása mellett.

Határozzuk meg a lappangási fázis t_L hosszát a lebontási görbéből (fél-logaritmikus ábrázolás) úgy, hogy extrapoláljuk ennek lineáris részét a zéró lebontásig, vagy úgy, hogy meghatározzuk a 10 %-os lebontáshoz szükséges időt (lásd 1a., 1b. ábra). A fél-logaritmikus ábrából becsüljük meg az elsőrendű sebességi állandót (k) és standard hibáját az idő függvényében felvett ln (maradó ^{14}C aktivitás vagy vizsgálati anyag-koncentráció) lineáris regressziójából. Főleg a ^{14}C méréseknél csak a görbének lappangási fázis vége utáni kezdeti lineáris szakaszát használjuk, és a kiválasztásnál a kisszámú, reprezentatív adatokat részesítsük előnyben a nagyobb számú, de bizonytalan adatokkal szemben. A bizonytalanság tartalmazza a mért maradó ^{14}C aktivitások javasolt direkt felhasználásából eredő hibákat (lásd lent). Ha a lebontás kétfázisú lefutást követ, néha fontos lehet két különböző sebességi állandó számítása. Ebből a célból a lebontási görbe két különböző fázisa definiálható. Az ugyanabból a lombikból vett minták esetében a párhuzamosokban minden egyes lombikra számítani kell a sebességi állandót (k) és a felezési időt ($t_{½}$ = ln2/k); vagy ha a lombik teljes tartalmát analizáljuk (lásd az 1.8.9.2. pont utolsó bekezdése), akkor az eredmények átlagából. Amikor az első módszert használjuk, a sebességi állandót és a felezési időt megadjuk a párhuzamosok minden egyes lombikjára, és ezek átlagát is a standard hibával. Magas koncentrációjú vizsgálati anyag esetében a lebontási görbe jelentősen eltérhet az egyenestől (fél-logaritmikus ábrázolás) és az elsőrendű kinetika érvénytelen lehet. Ennek következtében a felezési idő megadásának nincs értelme. Egy limitált adattartományra azonban használható pszeudo-elsőrendű kinetika, és a lebontási felezési idő DT_{50} (az 50 %-os lebontáshoz szükséges idő) becsülhető. Ugyanakkor fontos szem előtt tartani, hogy a lebontás időtartama a kiválasztott adattartományon túl a DT_{50} használatával nem határozható meg, mivel ez az érték csupán ennek az adatsornak a sajátja. A statisztikai számításokat és a görbeillesztést könnyítő segédeszközök könnyen hozzáférhetőek, és az ilyen típusú szoftverek alkalmazása ajánlott is.

▼M1

Specifikus kémiai analízis elvégzése esetén határozzuk meg a lebontási állandókat és felezési időket az elsődleges lebontásra, a teljes mineralizációra leírtak szerint (lásd fent). Ha az elsődleges lebontás a meghatározó folyamat, néha a teljes lebontási időtartam pontjai felhasználhatóak. Ennek oka az, hogy szemben a ^{14}C aktivitásméréssel, ezek a mérések direktek.

Ha ^{14}C-jelölt anyagot használunk, a tömegkiegyenlítést a bemért kezdeti koncentráció százalékában kell kifejezni, legalább a vizsgálat végeztével.

2.1.2. **Maradó aktivitás**

Amikor a ^{14}C-jelzett szerves anyag lebontódik, a ^{14}C nagy része $^{14}CO_2$-dá alakul, míg a másik része a biomassza növekedésére és/vagy extracelluláris metabolitok szintézisére használódik fel. Ennek következtében az anyag biológiai lebontásának maximális szintje nem eredményezi széntartalmának 100 %-os átalakulását $^{14}CO_2$-dá. A ^{14}C bioszintézis-termékekbe épül be, majd ezt követően, a másodlagos mineralizációnak köszönhetően lassan, $^{14}CO_2$ formában felszabadul. Ezen okok miatt a maradó ^{14}C aktivitás (a CO_2 kiűzése után) vagy az idő függvényében felvett termelődő $^{14}CO_2$ ábrázolásakor a lebontás befejeződése után egy „lecsengési fázist” fogunk látni. Ez bonyolultabbá teszi az adatok kinetikai interpretációját, ezért csupán a görbe kezdeti szakaszát (a lappangási fázis befejeződése után és a kb. 50 %-os lebontási szint elérése előtt) használjuk a lebontási sebességi állandó számításához. Ha a vizsgálati anyag lebomlik, a teljes maradó szerves ^{14}C aktivitás mindig nagyobb, mint a maradó intakt vizsgálati anyaghoz kapcsolható ^{14}C aktivitás. Ha a vizsgálati anyag elsőrendű reakció szerint bomlik, és egy állandó α mennyisége CO_2-dá mineralizálódik, a ^{14}C csökkenés görbéjének (teljes szerves ^{14}C az idő függvényében) kezdeti meredeksége α-szorosa lesz a vizsgálati anyag koncentrációjának (vagy egészen pontosan a vizsgálati anyag ^{14}C-gyel jelölt részének) megfelelő görbe meredekségének. A teljes szerves ^{14}C aktivitás korrigálatlan mért értékeit használva a számított lebontási sebességi állandó ennek következtében csak óvatos becslés lesz. Különféle egyszerűsítő feltételeken alapuló, a vizsgálati anyag koncentrációját a mért radiokémiai aktivitásokból becslő módszer a szakirodalomból ismert (2)(9)(10)(11). Az ilyen eljárások a legkönnyebben a gyorsan bomló anyagokra alkalmazhatóak.

2.2. AZ EREDMÉNYEK INTERPRETÁCIÓJA

Amennyiben k függetlennek bizonyul az alkalmazott koncentrációtól (azaz a k számított értéke közel azonos a különböző vizsgálati anyag-koncentrációk esetén) megállapítható, hogy az elsőrendű sebességi állandó reprezentatív az adott körülményekre, azaz a vizsgálati anyagra, a vízmintára és a teszthőmérsékletre. Hogy az eredmények milyen mértékben általánosíthatóak és vetíthetőek ki más rendszerekre, csak szakértői vélemények alapján határozható meg. Amennyiben a vizsgálati anyagot magas koncentrációban alkalmazzuk, és így a lebontás nem elsőrendű kinetikát követ, az adatok nem használhatóak fel elsőrendű lebontási sebességi állandó és a megfelelő felezési idő megadásához. Az ilyen adatok azonban még mindig használhatóak a teljes mineralizáció mértékének becslésére és/vagy a transzformációs termékek kimutatására és mennyiségi meghatározására.

▼M1

Amennyiben a biológiai lebontáson kívüli egyéb, a vizsgálati anyag mennyiségének csökkenésével járó folyamatok (hidrolízis vagy volatilizáció) sebessége ismert, ezek értékét a teljes koncentráció csökkenési sebességéből a vizsgálat során kivonva egy közelítő biológiai lebontási sebességet kaphatunk. A hidrolízis-adatokhoz a steril kontrollból vagy nagyobb koncentrációjú párhuzamos vizsgálati anyag-kísérletből juthatunk.

A $^{14}CO_2$ indirekt és direkt meghatározása (lásd 1.8.9.4. pont és 3. melléklet) csupán a vizsgálati anyag CO_2-dá történő mineralizációja mértékének mérésére használható. A ^{14}C-jelölt vizsgálati anyag koncentrációját és a fő transzformációs termék (lásd 1.8.9.4. pont harmadik bekezdését) keletkezését radiokromatográfiával (RAD-TLC) vagy HPLC-vel analizálhatjuk. A felezési idő direkt meghatározásához szükséges, hogy ne legyen jelen fő transzformációs termék (definíció szerint az alkalmazott vizsgálati anyag 10 %-a ≤). Ha a definíció szerint ilyen anyag jelen van, az adatok részletes kiértékelésére van szükség. Ez jelenthet megismételt vizsgálatot, és/vagy a transzformációs termék azonosítását (lásd 1.8.9.5. pont első bekezdése), hacsak a termék sorsa a gyakorlatban egyértelműen meg nem állapítható (pl. a lebontási útvonal ismerete). Mivel a vizsgálati anyag CO_2-dá alakult hányada változó (erősen függ a vizsgálati anyag és más hozzáférhető szubsztrátok koncentrációjától, a tesztkörülményektől és a mikrobiális populációtól) ez a vizsgálat nem alkalmas a teljes biológiai lebontás közvetlen számítására, amit pl. a DOC fogyási vizsgálatban láthatunk, de az eredmények hasonlóak a respirometriás vizsgálatból kaphatóakkal. A mineralizáció mértéke így a teljes biológiai lebontás minimális szintjénél kisebb, vagy azzal egyenlő lesz. Hogy még teljesebb képet kapjunk a teljes biológiai lebontásról (mineralizáció és biomasszába történő beépülés), a ^{14}C fázismegoszlásának analízisét a vizsgálat végén el kell végezni (lásd 1. melléklet). A ^{14}C a diszpergált fázisban a bakteriális biomasszába beépült ^{14}C-ből és a szerves részecskékhez tapadt ^{14}C-ből fog állni.

2.3. A VIZSGÁLAT VALIDITÁSA

Amennyiben a referenciaanyag nem bomlik le a várt időtartam alatt (anilinre és nátrium-benzoátra általában kevesebb mint két hét), a vizsgálat validitása kétségbe vonható és további ellenőrzése szükséges, vagy a vizsgálatot új vízmintával meg kell ismételni. A módszer egy ISO-körméréses tesztsorozatában, amelyben Európa-szerte hét laboratórium vett részt, az anilinre alkalmas lebontási sebességi állandó a 0,3–1,7 nap^{-1}-es tartományban mozgott, 20 °C-on 0,8 nap^{-1}-es átlaggal és ± 0,4 nap^{-1} standard hibával ($t_{½}$ = 0,9 nap). A vizsgált vízmintákra vonatkozóan milliliterenként 10^3–10^4 CFU-nak (telepképző egység) megfelelő bakteriális biomassza-tartalmat írtak le. A lebontási sebességek az ásványi anyagban dúsabb közép-európai vizekben nagyobbak voltak, mint a skandináv oligotróf vizekben, amit a különböző ásványianyag-ellátottság, vagy a kémiai anyagokkal való előzetes kitettség okozhat.

A kísérlet végén a teljes visszanyerésnek (anyagmérleg) 90 és 110 % között kell lennie radioaktívan jelölt anyagoknál, míg nem jelölt anyagok esetében a kezdeti visszanyerésnek (recovery) a kísérlet kezdetén 70 és 110 % között kell lennie. Az említett tartományok azonban csak megcélzandó értékek, és nem használhatók a vizsgálat elfogadhatósági kritériumaiként.

▼M1

3. **VIZSGÁLATI JEGYZŐKÖNYV**

A vizsgálat típusának (azaz nyílt vízi vagy lebegő üledék vizsgálat) egyértelműen meg kell jelennie a vizsgálat jegyzőkönyvében, amelynek az alábbi információt is tartalmaznia kell:

Vizsgálati anyag és referenciaanyag(ok):

— közkeletű nevek, kémiai elnevezések (ajánlottak a IUPAC és/vagy CAS elnevezések), CAS számok, szerkezeti képletek (ha az alkalmazott anyag radioaktívan jelölt a ^{14}C pozíciójának megjelölésével) és a vizsgálati anyag és referenciaanyag fontos fizikokémiai tulajdonságai (lásd 1.5. és 1.6. pont),

— a transzformációs termék azonosításához és mennyiségi meghatározásához használt standardok kémiai elnevezései, CAS számai, szerkezeti képletei (ha az alkalmazott anyag radioaktívan jelölt, a ^{14}C pozíciójának megjelölésével), fontos fizikokémiai tulajdonságai,

— a vizsgálati anyag és referenciaanyag tisztasága (szennyezései),

— a jelölt vegyület radiokémiai tisztasága és specifikus aktivitása (ahol szükséges).

Felszíni víz:

A levett vízmintáról az alábbi minimális információkat közre kell adni:

— a mintavételi hely fekvése és leírása, ha lehetséges, szennyezettségi előtörténete,

— a mintavétel időpontja,

— ásványi anyagok (totál N, ammónium, nitrit, nitrát, totál P, oldott ortofoszfát),

— mintavételi mélység,

— a minta állaga (pl. szín és zavarosság),

— DOC és TOC,

— BOD,

— hőmérséklet és pH a mintavétel helyén és idején,

— oxigén vagy redoxpotenciál (csak abban az esetben kötelező, ha az aerob körülmények megléte nem nyilvánvaló),

— ionerősség vagy konduktivitás (tengervíz és brakk víz esetében),

— lebegő szilárd anyagok (zavaros minta esetén),

— egyéb, esetleg fontos információk a mintavétel időpontjában a mintavétel helyszínéről (pl. a folyók, vagy tengeráramlatok aktuális vagy múltbéli adatai, közeli fő kiömlések és ezek típusa, időjárási körülmények a mintavétel időpontját megelőzően),

és választhatóan:

— mikrobiális biomassza (pl. akridinnarancs direkt sejtszám vagy telepképző egység),

▼M1

— szervetlen szén,

— klorofill-a koncentráció, mint az alga- biomassza speciális mérése.

Ezen túlmenően lebegő üledék vizsgálat végzése esetén az alábbi információkat kell rendelkezésre bocsátani az üledékről:

— az üledék mintavételi mélysége,

— az üledék állaga (úgymint színes, saras, iszapos, vagy homokos),

— textúra (pl. durva homok, finom homok, iszap és agyag %-ban),

— a lebegő szilárd anyag száraztömege g/l-ben, TOC koncentráció vagy égetés során fellépő tömegcsökkenés mint a szervesanyag-tartalom mérőszáma,

— pH,

— oxigén vagy redoxpotenciál (csak abban az esetben kötelező, ha az aerob körülmények megléte nem nyilvánvaló).

Tesztkörülmények:

— a mintavétel és a laboratóriumi felhasználás között eltelt idő, mintatárolás és a minta előkezelése, a vizsgálatok kivitelezésének időpontja,

— az alkalmazott vizsgálati anyag mennyisége, tesztkoncentráció és referenciaanyag,

— a vizsgálati anyag alkalmazásának módszere, oldószer használata,

— a használt felszíni víz és üledék (ha használjuk) térfogata, és az egyes időközönként analízisre levett minták térfogata,

— az alkalmazott tesztrendszer leírása,

ha a kivitelezés nem sötétben folyik, a szórt fényre vonatkozó információ;

— információ a steril kontrollok beállításának módszereiről (pl. hőmérséklet, az autoklávozások ideje és száma),

— inkubációs hőmérséklet,

— információ az analitikai technikákról, a radiokémiai mérési módszerekről, a tömegkiegyenlítés ellenőrzésének és a fázismegoszlás mérésének (amennyiben használjuk) módszeréről,

— a párhuzamosok száma.

Eredmények:

— a visszanyerés százaléka (lásd 1.7.1. pont),

— az alkalmazott analitikai módszer ismételhetősége és érzékenysége, beleértve a mennyiségi meghatározási határt (LOD) és a mérhetőségi határt (LOQ) (lásd 1.7.2. pont),

▼M1

— az összes mért adat (beleértve a mintavételi időpontokat) és számított érték táblázatos formában, a lebontási görbe minden egyes tesztkoncentrációra minden párhuzamosban, a logaritmikus ábrázolás meredekségének korrelációs koefficiense, a becsült lappangási fázis és az elsőrendű vagy pszeudo-elsőrendű sebességi állandó (ha lehet), és a megfelelő lebontási felezési idő (vagy féléletidő, t_{50}),

— fontos értékek, mint az egyedi mintákból kapott eredmények átlagai, pl. a lappangási fázis hossza, lebontási sebességi állandó, lebontási felezési idő (vagy t_{50}),

— a rendszer nem adaptálódottként, vagy adaptálódottként történő kategorizálása a lebontási görbe lefutásából, vagy a tesztkoncentráció esetleges hatásából,

— a végső anyagmérleg-ellenőrzés eredményei és a fázismegoszlás-mérések eredményei (ha vannak),

— a mineralizálódott ^{14}C aránya és specifikus kémiai analízis használata esetén az elsődleges biológiai lebontás végső szintje,

— az alkalmazott és fő transzformációs termékek azonosítása, moláris koncentrációja és százalékos aránya (lásd az 1.8.9.5. pont első bekezdése), ahol szükséges,

— a transzformáció feltételezett lebontási útja, ahol szükséges,

— az eredmények összegzése.

4. **IRODALOM**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test

2. ISO/DIS 14592–1 (1999) Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

4. Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality – Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22 (to be published summer 2000).

▼**M1**

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394–401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274–283.

11. ISO/CD 14592–1 (1999). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼M1

1. melléklet

A ^{14}C Fázismegoszlása

Az eljárás ellenőrzéséhez a maradó teljes szerves ^{14}C aktivitás (TOA) rutinvizsgálatait ki kell egészíteni a tömegkiegyenlítés-mérésekkel, amelyek magukban foglalják a képződő, abszorbenssel megkötött $^{14}CO_2$ direkt meghatározását is (lásd 3. melléklet). A pozitív $^{14}CO_2$ termelődés önmagában közvetlen bizonyíték a biológiai lebontásra, szemben az abiotikus lebontással, vagy más anyagvesztési mechanizmussal, mint a volatilizáció és a szorpció. A biológiai lebontási viselkedést jellemző hasznos többletinformáció nyerhető a részecskék membránszűréssel vagy centrifugálással történő eltávolítását követően, az oldat fázis (oldott szerves ^{14}C aktivitás, DOA) és a szuszpenzió fázis (szuszpendált szerves ^{14}C aktivitás, POA) közötti TOA megoszlásának méréséből. A POA a mikrobiális biomasszára és más részecskékre kitapadt vizsgálati anyagból, és e mellett a vizsgálati anyag széntartalmának azon részéből áll, amely a szaporodó sejtek anyagának szintézisére fordítódik, és így beépül a szuszpendált biomassza frakcióba. Az oldott ^{14}C szerves anyag képződése DOA-ként mérhető a biológiai lebontás végén (a degradáció-idő görbe telítési szakasza).

Számítsuk ki a maradó ^{14}C fázismegoszlását a kiválasztott, 0,22–0,45 μm-es szűrőkön átszűrt mintákban. A szűrő anyaga nem adszorbeálhat jelentősebb mennyiségű vizsgálati anyagot (a polikarbonát filterek megfelelőek lehetnek). Ha a vizsgálati anyag szorpciója a filteren túl nagy mértékű (a kísérletet megelőzően tesztelni kell), használatát mellőzzük, helyette nagysebességű centrifugálás (2 000 g; 10 perc) használható.

A szűrlettel vagy a centrifugált mintával járjunk el a 3. melléklet szűretlen mintákra leírt módszere szerint. Oldjuk fel a membránfiltert a megfelelő szcintillációs folyadékban, és mérjük a beütésszámot a szokott módon, a kioltás korrigálására normálisan a külső standard-arány módszert, vagy mintaoxidálást használva. Ha centrifugálást használtunk, reszuszpendáljuk a részecskéket tartalmazó fázist 1–2 ml desztillált vízben, és juttassuk szcintillációs üvegcsébe. Ezt követően mossuk még kétszer, 1–1 ml desztillált vízzel, és a mosóvizet is juttassuk az üvegcsébe. Ha szükséges, a folyadékszcintillációs méréshez a szuszpenzió gélbe is ágyazható.

▼M1

2. melléklet

Félfolyamatos eljárás

A nehezen bomló anyagok megfelelő lebontásának eléréséhez meghosszabbított, több hónapos inkubáció is szükséges lehet. A tesztidőszak hossza normál esetben nem haladhatja meg a 60 napot, hacsak az eredeti vízminta jellemzőinek fenntartása nem a tesztszuszpenzió lecserélésével történik. Mindamellett a tesztperiódust ki lehet terjeszteni maximum 90 napra a tesztszuszpenzió lecserélése nélkül is, ha a vizsgálati anyag lebontása az első 60 napon belül megkezdődött.

Hosszú idejű inkubáció során a mikrobiális populáció diverzitása különböző anyagvesztési mechanizmusok, valamint a vízminta alapvető ásványisó-tartalmának és elsődleges széntartalmú szubsztrátjainak kimerülése miatt lecsökkenhet. A lassan bomló anyagok esetében a lebontási sebesség pontos meghatározásához ezért a félfolyamatos vizsgálat alkalmazása ajánlott. Ha az előzetes tapasztalatok alapján a vizsgálati anyag 20 %-os lebontásának eléréséhez egy három hónapos inkubáció várható, a vizsgálatot a félfolyamatos eljárással kell elősegíteni. A másik megoldás az lehet, hogy ha a vizsgálati anyag lebontása egymenetes körülmények között körülbelül 60 nap alatt nem történik meg, akkor a normál egymenetes vizsgálatot a félfolyamatos vizsgálatra váltjuk. A félfolyamatos eljárás is leállítható és egymenetes kísérletként folytatható, ha jellemző lebontás történik (pl. > 20 %).

A félfolyamatos vizsgálatban a vizsgálati szuszpenzió térfogatának körülbelül harmadát kéthetente a kiindulási koncentrációra beállított, vizsgálati anyaggal ellátott, frissen vett vízzel cseréljük le. Ha a választható lebegő üledék vizsgálatot hajtjuk végre, akkor üledéket adunk ugyanígy cserevízhez, a kezdeti koncentrációt (0,01 és 1 g/l között) hozva létre. A lebegő üledék vizsgálat kivitelezése során fontos, hogy a rendszert teljesen felszuszpendáljuk a vízcseréhez is, valamint hogy a tartózkodási időnek azonosnak kell lennie a szilárd anyagokra és a vízre, mivel egyébként a kívánt hasonlóságot a homogén vizes rendszerekkel elveszthetjük. Ezen okok miatt a félfolyamatos eljárás alkalmazása során a lebegő üledék kezdeti koncentrációjának a megadott intervallum alsó tartományába kell esnie.

A vizsgálati anyag előírt hozzáadásába beleértendő, hogy a vizsgálati anyag kezdeti koncentrációját a tesztszuszpenzió részleges megújításával nem lépjük túl, ennélfogva az adaptáció jelensége, ami a vizsgálati anyag magas koncentrációinál gyakran fellép, kiküszöbölődik. Mivel az eljárás mind re-inokulációval, mind a kimerülő ásványi anyagok és elsődleges szubsztrátok pótlásával jár, a vizsgálat hossza alapjában véve korlátlanul megnyújtható. Fontos megjegyezni, hogy félfolyamatos eljárás alkalmazása esetén a vizsgálati anyag maradó koncentrációját korrigálni kell az egyes cserék során hozzáadott és eltávolított vizsgálati anyag-mennyiséggel. A teljes és az oldott vizsgálati anyag-koncentráció a csekély mértékben adszorbeálódó vegyületek esetében felcserélhető egymással. A szorpció az adott körülmények között (0,1–1 g szilárd anyag/l) a log K_{ow} < 3 értékű (neutrális, lipofil vegyületekre érvényes) anyagokra vonatkozóan elhanyagolható (< 5 %). Ezt a következő számítási példán keresztül mutatjuk be. 0,1 g/l szilárd anyag durván 10 mg szénnek felel meg literenként (szénfrakció, f_C = 0,01). Ha feltételezzük, hogy:

Log K_{ow} (vizsgálati anyag) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

Megoszlási koefficiens, $K_d = f_C \times K_{oc}$

akkor a teljes koncentráció oldott frakciója (C-víz (C_w)/C-teljes (C_t):

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

3. melléklet

A $^{14}CO_2$ meghatározása

Indirekt $^{14}CO_2$ meghatározás

Rutinmérésekhez az indirekt módszer általában a legkevésbé időigényes és legpontosabb módszer, ha a vizsgálati anyag nem illékony és nem alakul át illékony transzformációs termékekké. Egyszerűen juttassuk a szűretlen mintákat, pl. 5 ml térfogatú szcintillációs üvegcsékbe. Kezdetben a megfelelő aktivitás a mintákban 5 000 dpm–10 000 dpm (80–170 Bq), és a minimum kezdeti aktivitás kb. 1 000 dpm. Az egy-két csepp tömény H_3PO_4-val vagy HCl-val pH 2–3-ra történő savanyítás után a CO_2-t ki kell űzni a rendszerből. Ez kb. fél-egy órán át tartó levegő-átbuborékoltatással történhet. Más megoldásként az üvegcsék intenzíven rázathatók 1–2 óráig (például mikrotányéros rázón), vagy óvatosabb rázatás mellett egy éjszakán keresztül. A CO_2 kiűzésének hatásfokát ellenőrizni kell (a levegőztetés vagy a rázatási periódus meghosszabbításával). Ezután a vizes minták beütésszámának meghatározására alkalmas szcintillációs folyadékot adunk a rendszerbe, majd a minta vortexes homogenizálása után a radioaktivitás folyadék szcintillációs méréssel, a vizsgálat vakok (F_B) háttéraktivitásának kivonásával meghatározható. Hacsak a tesztvíz nem nagyon színes, vagy nem tartalmaz nagy koncentrációban részecskéket, a minták rendes körülmények között egységes kioltást mutatnak, és elegendő külső standard alkalmazásával kioltási korrekciót végezni. Ha a tesztvíz nagyon színes, a kioltási korrekciót belső standard hozzáadása révén szükséges kalkulálni. Ha részecske-koncentráció magas, nem mindig lehetséges homogén oldathoz vagy gélhez jutni, vagy nagy lehet a kioltás eltérése a minták között. Ilyen esetekben az alábbiakban bemutatott tesztzagy-mérési módszert kell alkalmazni. Ha a vizsgálat mint lebegő üledék vizsgálatot végezzük el, a $^{14}CO_2$ mérést indirekt módon kell elvégezni egy homogén 10 ml-es tesztvíz/szuszpenzió mintából, ahol a fázisokat megfelelő sebességű (pl. 40 000 m/s^2-en 15 percig) centrifugálással szeparáltuk. Ezután a vizes fázissal a fentiek szerint járunk el. A ^{14}C aktivitás mérése a lebegő részecskéket tartalmazó fázisból (POA) úgy történik, hogy az üledéket kevés vízben reszuszpendáljuk, majd szcintillációs üvegcsékbe juttatjuk és szcintillációs folyadékot adunk hozzá, hogy gél jöjjön létre (erre a célra speciális szcintillációs folyadékok szerezhetőek be). A részecskék természetétől (pl. szervesanyag-tartalmuk) függően megvalósítható lehet a minták szövet-szolubilizálóval történő, egy éjszakán keresztüli emésztése, majd a szcintillációs folyadék hozzáadását megelőző vortexes homogenizálása. Más megoldásként a POA oxigénfeleslegben, mintaoxidálóval történő hevítés segítségével is meghatározható. A mérés során mindig használni kell belső standardokat, valamint szükséges lehet kioltási korrekciókat végrehajtani belső standard hozzáadásával, minden egyes egyedi mintára vonatkozóan.

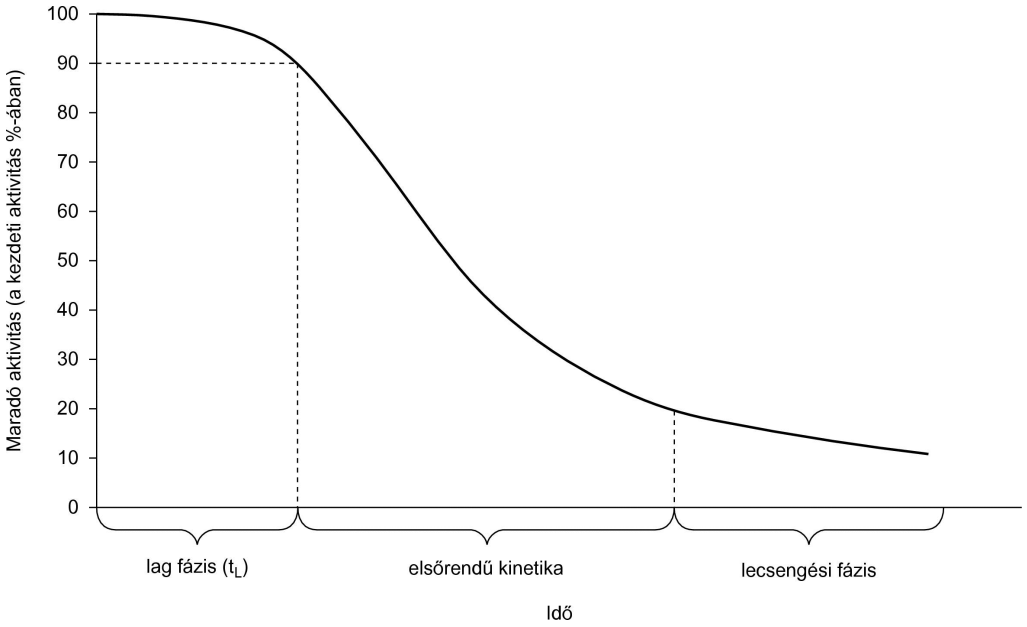
Direkt $^{14}CO_2$ meghatározás

Ha a képződő $^{14}CO_2$-t közvetlenül mérjük, akkor a vizsgálat kezdetekor több lombikot kell beállítani, majd begyűjtéskor a vzsgálati lombikokat pH 2–3 közé kell savanyítani minden egyes mérési pontnál, és a $^{14}CO_2$-t fel kell fogni egy (a vizsgálat kezdetekor minden egyes vizsgálati lombikba behelyezett) belső vagy külső abszorberrel. Az abszorbeáló anyag lehet lúg (pl. 1 N NaOH oldat, vagy NaOH golyó), etanolamin vagy egy etanolamin-alapú, kereskedelmi forgalomból beszerezhető abszorber. A $^{14}CO_2$ direkt méréséhez a lombikokat le kell zárni pl. butilgumi szeptummal.

▼**M1**

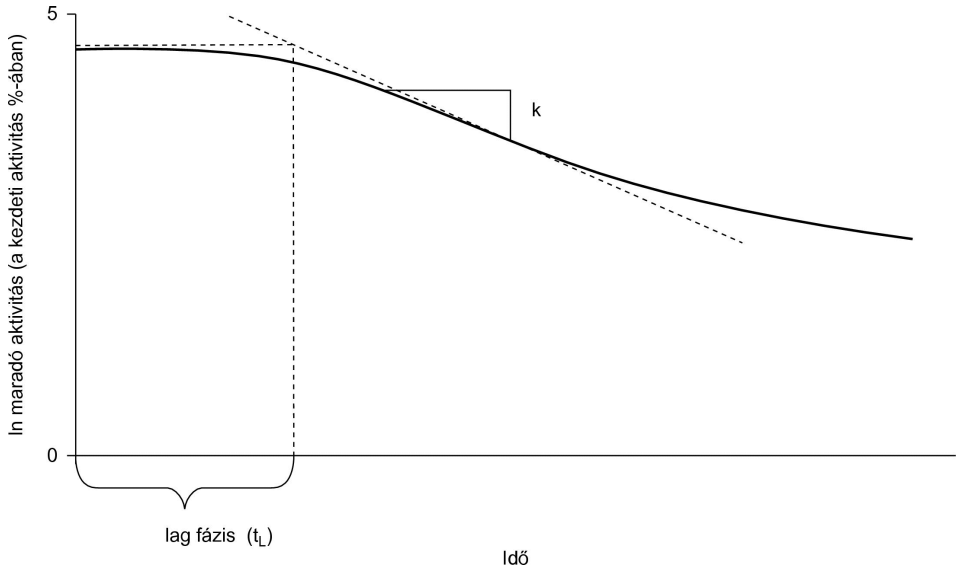
1a. ábra

Példa az adatok grafikus ábrázolására (maradó aktivitás az idő függvényében)



1b. ábra

Példa az adatok fél-logaritmikus ábrázolására (ln maradó aktivitás az idő függvényében)



▼M6

C.26. A *LEMNA*-FAJOK NÖVEKEDÉSGÁTLÁSI VIZSGÁLATA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 221. vizsgálati iránymutatásában (2006) leírt módszerrel. Ez a vizsgálati módszer a különböző vegyi anyagok által a *Lemna* (békalencse) nemzetséghez tartozó édesvízi növényekre kifejtett toxikus hatás meghatározására szolgál. A módszer meglévő módszereken (1)(2)(3)(4)(5)(6) alapul, de azoktól több kulcsfontosságú kérdés tekintetében, a legfrissebb kutatási eredmények és szakmai egyeztetések figyelembevétele érdekében eltér. A vizsgálati módszer validálása nemzetközi körvizsgálattal (7) történt.

2. A vizsgálati módszer *Lemna gibba* és *Lemna minor* felhasználásával végzendő toxicitási vizsgálatot ír le; mindkét fajon számos vizsgálatot végeztek, és a fent említett szabványosított vizsgálatok is ezekre vonatkoznak. A *Lemna* nemzetség rendszertana nehezen leírható, amit tovább bonyolít a létező fenotípusok nagy száma. Bár a *Lemna* nemzetségben a genetikai eltérések a toxikus anyagokkal szembeni viselkedés változatosságát eredményezhetik, erről a változóról egyelőre kevés adat áll rendelkezésre ahhoz, hogy az ismertetendő eljárás keretében konkrét klón használatát ajánlhassunk. Megjegyzendő, hogy a vizsgálat nem steril körülmények között zajlik, de az eljárás egyes szakaszaiban erőfeszítéseket kell tenni annak érdekében, hogy más élő szervezetek zavaró hatása a lehető legkisebb legyen.

3. Az alábbiakban részletesen ismertetjük a vizsgálati oldat cseréjével végzett (félstatikus és állandó áramlású) és a vizsgálati oldat cseréje nélkül végzett (statikus) vizsgálatokat. A vizsgálat céljától és a jogszabályi követelményektől függően a félstatikus és az átfolyásos vizsgálat alkalmazását például az oldatból gyorsan eltávozó (illékony, fény hatására lebomló, kicsapódó vagy biológiailag lebomló) vegyi anyagok esetén érdemes megfontolni. További iránymutatást a (8) irodalom tartalmaz.

4. A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

5. Exponenciálisan növekedő, a *Lemna* nemzetséghez tartozó növénytenyészeteket monokultúraként hét napig növekedni hagyunk a vizsgált vegyi anyag különböző koncentrációinak jelenlétében. A vizsgálat célja: a vizsgálat időtartama alatt a vizsgált vegyi anyag vegetatív növekedésre gyakorolt hatásának számszerű kifejezése alkalmasan megválasztott mérési változók értékelése alapján. Elsődleges mérési változóként a levélszám szolgál. Emellett legalább még egy mérési változót (a levelek összterületét, a száraz tömeget vagy a nedves tömeget) is mérni kell, mert bizonyos vegyi anyagok más mérési változókat sokkal inkább befolyásolnak, mint a levélszámot. A vizsgált vegyi anyag hatásainak számszerű kifejezése érdekében a vizsgálati oldatban bekövetkező növekedést összehasonlítjuk a kontrolltenyészetben bekövetkező növekedéssel, és meghatározzuk azt az EC_x (például EC_{50}) koncentrációt, amely egy adott x %-os (például 50 %-os) növekedésgátlást idéz elő.

6. A vizsgálat végpontjaként a növekedésgátlás szolgál, amelyet a mérési változóban az expozíciós idő alatt bekövetkező logaritmikus növekedéssel (az átlagos fajlagos növekedési sebességgel) fejezünk ki. A kísérleti oldatsorozattal mért átlagos fajlagos szaporodási sebességekből meg kell határozni azt a koncentrációt, amely a szaporodási sebességet adott x %-os (pl. 50 %-os) mértékben gátolja, és azt E_rC_x-ként (pl. E_rC_{50}) kell kifejezni.

7. Az eljárás másik hatásváltozója a szaporulat, amelyre bizonyos országok esetében a jogszabályi követelmények teljesítéséhez lehet szükség. A szaporulat a mérési változóknak az expozíciós idő végén érvényes értéke és az expozíciós idő kezdetén érvényes értéke közötti különbséget jelenti. A vizsgálati oldatok tekintetében egyenként kiszámított szaporulatok alapján meghatározzuk azt az E_yC_x (például E_yC_{50}) koncentrációt, amely egy adott x %-os (például 50 %-os) növekedésgátlást idéz elő.

▼M6

8. Statisztikai eljárással meghatározható továbbá az észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció (LOEC) és az észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC) értéke is.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

9. Rendelkezésre kell állnia egy olyan analitikai eljárásnak, amellyel a vizsgálati oldatban lévő vegyi anyag mennyisége kellő pontossággal meghatározható.

10. A vizsgálati körülmények rögzítése érdekében célszerű lehet tájékozódni többek között a vizsgált anyag szerkezeti képletéről, tisztaságáról, vízben való oldhatóságáról, vízben és fény hatására tanúsított stabilitásáról, pKa és K_{ow} értékéről, gőznyomásáról és biológiai lebonthatóságáról. A vízben való oldhatóságból és a gőznyomásból meghatározható a Henry-állandó, amely megmutatja, mennyire kell arra számítani, hogy a vizsgálat során a vizsgált vegyi anyag jelentős mennyiségben eltávozik. Ennek alapján eldönthető, kell-e külön gondoskodni az így adódó veszteségek ellensúlyozásáról. Ha a vizsgált vegyi anyag oldhatóságára és stabilitására vonatkozó információk bizonytalanok, célszerű ezeket a vizsgálat körülményei, azaz a vizsgálati oldat, hőmérséklet és fényviszonyok mellett meghatározni.

11. Ha különösen fontos a vizsgálati oldat pH-értékének szabályozása, például könnyen hidrolizálódó fémek vagy egyéb vegyi anyagok vizsgálata esetén, akkor ajánlatos a vizsgálati oldatot pufferrel kiegészíteni (lásd a 21. pontot). A (8) irodalom további iránymutatást ad olyan vegyi anyagok vizsgálatához, amelyek fizikai-kémiai jellegzetességeiknél fogva nehezen vizsgálhatók.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

12. A vizsgálat akkor érvényes, ha a kontrolltenyészetben a levélszám megkettőződési ideje 2,5 napnál (60 óránál) kisebb, ami hét nap alatt körülbelül hétszeres növekedést, illetve 0,275 1/nap átlagos fajlagos növekedési sebességet jelent. A jelen módszerben ismertetett vizsgálati oldat és vizsgálati körülmények alkalmazása esetén ez a feltétel statikus vizsgálattal kielégíthető (5). Várható, hogy a feltétel félstatikus és állandó áramlású vizsgálat esetén is kielégíthető. A megkettőződési idő számítását a 49. pont ismerteti.

REFERENCIA-VEGYIANYAG

13. A vizsgálati eljárás referencia-vegyianyag(ok), mint például a nemzetközi körvizsgálatban (7) alkalmazott 3,5-diklór-fenol segítségével ellenőrizhető. Referencia-vegyianyaggal legalább évente kétszer (ha ennél ritkábban végzünk vizsgálatot, akkor a vizsgált vegyi anyag toxicitásának meghatározásával párhuzamosan mindig) ajánlott vizsgálatot végezni.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

14. Minden, a vizsgálati oldattal érintkező eszköz üvegből vagy más, kémiailag semleges anyagból legyen. A tenyésztés és a vizsgálat céljára felhasznált üvegeszközök sterilek legyenek, és meg kell őket tisztítani minden olyan kémiai szennyeződéstől, amely a vizsgálati oldatba bemosódhatna. A vizsgálati edények legyenek kellően szélesek ahhoz, hogy a kontrolltenyészetekben a különböző telepek levelei a vizsgálat végéig átfedésmentesen növekedhessenek. Nem jelent problémát, ha a gyökér az edény alját éri, de ajánlatos legalább 20 mm mélységű és legalább 100 ml térfogatú vizsgálati edényeket alkalmazni. Ha ezek a feltételek teljesülnek, a vizsgálati edények megválasztása nem kritikus. A korábbiakban a kellő méretű üveg főzőpoharak, kristályosító tégelyek és üveg Petri-csészék egyaránt alkalmasnak bizonyultak. A vizsgálati edényeket a párolgás és a véletlen szennyeződések

▼M6

megakadályozása érdekében le kell fedni oly módon, hogy a levegő cserélődhessen. A vizsgálati edény, különösen pedig a fedő lehetőleg ne keltsen árnyékot vagy okozza a fény spektrális jellemzőinek módosulását.

15. A tenyészeteket és a vizsgálati edényeket ne tartsuk együtt. A legjobb megoldás, ha külön környezeti növesztőkamrákat, inkubátorokat vagy helyiségeket veszünk igénybe. A fényviszonyok és a hőmérsékletek szabályozhatók legyenek, és állandó szinten kell őket tartani (lásd a 35-36. pontot).

Vizsgált szervezet

16. A vizsgálat során *Lemna gibba* vagy *Lemna minor* egyedeket kell használni. A toxicitási vizsgálatokhoz korábban már felhasznált békalencsefajok rövid leírását az 2. függelék adja meg. A növényanyag törzsgyűjteményből, más laboratóriumból vagy a terepről nyerhető. A terepről származó növényanyag tenyészetét felhasználás előtt legalább nyolc hétig a vizsgálat során alkalmazandóval megegyező tápoldatban kell tartani. A tenyészet kialakításához a növényanyagot nyilvánvaló szennyeződéstől mentes helyszínről kell begyűjteni. A más laboratóriumból vagy törzsgyűjteményből származó növényanyagot legalább három hétig kell hasonló körülmények között tartani. A mérési jegyzőkönyvben mindig rögzíteni kell a növényanyag eredetét és a vizsgálathoz felhasznált fajt és klónt (ha ismert).

17. Olyan monokultúrát használjunk, amelyet más élő szervezetek, például algák vagy egysejtűek szemmel érzékelhető módon nem szennyeznek. Az egészséges *L. minor* növények kettő–öt levélből állnak, míg a *L. gibba* egészséges telepei akár hét levelet is tartalmazhatnak.

18. A vizsgálat során felhasznált növények minősége és egységessége jelentősen befolyásolja a vizsgálat eredményeit, ezért megválasztásuk során kellő gondossággal kell eljárni. Fiatal, gyorsan növekvő, látható sérüléstől és fakulástól (klorózistól) mentes egyedeket kell felhasználni. A jó minőségű tenyészetet az jellemzi, hogy nagy arányban tartalmaz legalább két levélből álló telepeket. A sok egyedülálló levél kedvezőtlen környezeti körülményekre, például tápanyaghiányra utal, ezért ilyen tenyészetekből vett egyedeket nem szabad a vizsgálatban felhasználni.

Tenyésztés

19. Az átoltás gyakoriságának csökkentése érdekében (például ha egy ideig előreláthatóan nem végzünk *Lemna*-vizsgálatokat) a tenyészet csökkentett fényviszonyok mellett és hőmérsékleten (4–10 °C) tartható. A tenyésztés körülményeit részletesen a 3. függelék ismerteti. Ha olyan nyilvánvaló jeleket figyelünk meg, amelyek algák vagy más élő szervezetek okozta szennyeződésre utalnak, akkor a *Lemna*-levelek egy részét felületi sterilizálásnak kell alávetni, majd másik oldatba kell áthelyezni (lásd a 3. függeléket). Ebben az esetben a fennmaradó szennyezett kultúrát meg kell semmisíteni.

20. A vizsgálatok előtt legalább hét nappal elegendő mennyiségű telepet csíramentesen friss, steril oldatba kell áthelyezni, majd hét–tíz napon át a vizsgálatnak megfelelő körülmények között tartani.

Vizsgálati oldat

21. *Lemna minor* és *Lemna gibba* esetén eltérő oldatot ajánlott alkalmazni az alábbiak szerint. Kellő körültekintéssel meg kell fontolni pH-puffer alkalmazását a vizsgálati oldatban (MOPS (4-morfolinpropánszulfonsav, CAS-szám: 1132-61-5 a *L. minor* és $NaHCO_3$ a *L. gibba* vizsgálati oldatában), ha gyanítható, hogy az oldat reakcióba léphet a vizsgált anyaggal és befolyásolhatja a toxikus hatást. Az érvényességi kritériumok betartása mellett Steinberg-féle tápoldat (9) is alkalmazható.

▼M6

22. A *L. minor* tenyésztése és vizsgálata során a svéd szabvány (SIS) szerinti *Lemna*-tápoldat módosított változatát ajánlott alkalmazni. E tápoldat összetételét a 4. függelék ismerteti.

23. A *L. gibba* tenyésztése és vizsgálata során a 4. függelék szerinti 20X–AAP tápoldatot ajánlott alkalmazni.

24. A 4. függelék szerinti Steinberg-féle tápoldat ugyancsak alkalmas *L. minor* esetén, és az érvényességi kritériumok betartása mellett *L. gibba* esetén is alkalmazható.

Vizsgálati oldatok

25. A vizsgálati oldatokat általában törzsoldat hígításával állítjuk elő. A vizsgált vegyi anyag törzsoldatait általában úgy készítjük, hogy a vegyi anyagot tápoldatban feloldjuk.

26. A vizsgált vegyi anyag legnagyobb vizsgálati koncentrációja általában ne haladja meg a vegyi anyag vizsgálati körülmények között érvényes vízben való oldhatóságát. Megjegyzendő azonban, hogy a *Lemna* nemzetség egyedei a víz felszínén úsznak, ezért olyan vegyi anyagok hatásának is ki lehetnek téve, amelyek jellemzően a víz és a levegő határfelületén fordulnak elő (például vízben nehezen oldódó vagy víztaszító vegyi anyagok, felületaktív vegyi anyagok). Ilyenkor az expozíció nem a vizsgálati oldatban lévő anyag következtében áll elő, és a vizsgálati koncentráció a vizsgált vegyi anyag jellemzőitől függően meghaladhatja a vízben való oldhatóságot. Vízben kismértékben oldódó vizsgált vegyi anyag esetén szükséges lehet szerves oldó- vagy diszpergálószer alkalmazásával nagy koncentrációjú törzsoldatot vagy -diszperziót készíteni annak érdekében, hogy könnyebb legyen a vizsgált vegyi anyagból a pontos mennyiséget a vizsgálati oldathoz adagolni, és könnyebben végbemenjen az oldódás vagy a diszperzióképződés. Ilyen anyag alkalmazását lehetőség szerint kerülni kell. A segédoldószer vagy -diszpergálószer alkalmazása nem járhat fitotoxikus hatással. A széles körben alkalmazott oldószerek közül például az aceton vagy a dimetil-formamid 100 µl/l koncentrációig nem okoz fitotoxikus hatást. Az esetleg alkalmazott oldó- vagy diszpergálószer végső koncentrációja – amelyet a mérési jegyzőkönyvben rögzíteni kell – a lehető legkisebb legyen (≤ 100 µl/l), és az oldó- vagy diszpergálószert a vizsgálathoz és a kontrolltenyészet esetében azonos koncentrációban kell alkalmazni. A (8) irodalom bővebb iránymutatást ad a diszpergálószerekre vonatkozóan.

Vizsgálati csoportok és kontrollcsoportok

27. A vizsgált vegyi anyag *Lemna*-fajokra gyakorolt toxikus hatásának előzetes ismerete alapján, amely származhat például koncentrációtartomány-meghatározási vizsgálatból, megválaszthatók az alkalmas vizsgálati koncentrációk. A végleges toxicitási vizsgálatnak általában öt, egymással mértani sorozatot alkotó vizsgálati koncentrációra kell kiterjednie. A koncentrációk sorozatának hányadosa általában ne legyen 3,2-nél nagyobb, de lapos koncentráció-válasz görbe esetén ennél nagyobb érték lehet indokolt. Ötnél kevesebb koncentráció alkalmazását indokolni kell. Minden koncentrációval legalább három ismétlést kell megvizsgálni.

28. A vizsgálati koncentrációk tartományának kijelölése során (akár a koncentrációtartomány-meghatározási vizsgálatot, akár a végleges vizsgálatot megelőzően) a következőket célszerű megfontolni:

— EC_x meghatározása esetén a kellő konfidenciaszint biztosítása érdekében a vizsgálati koncentrációknak közre kell fogniuk az EC_x értékét. Ha például az EC_{50} értéket kívánjuk meghatározni, akkor a legnagyobb vizsgálati koncentrációnak nagyobbnak kell lennie EC_{50}-nél. Ha az EC_{50} kívül esik a vizsgálati koncentrációk tartományán, akkor a kiadódó konfidenciaintervallumok szélesek lesznek, és előfordulhat, hogy nem végezhető el a modell statisztikai illesztése.

— LOEC és/vagy NOEC meghatározása esetén a legkisebb vizsgálati koncentráció legyen elegendően kicsiny ahhoz, hogy a növekedési sebesség ne legyen jelentősen kisebb, mint a kontrollcsoportban. A legnagyobb koncentráció ugyanakkor legyen elegendően nagy ahhoz, hogy a növekedési sebesség jelentősen kisebb legyen, mint a kontrollcsoportban. Ha ez

▼M6

nem teljesül, a vizsgálatot más koncentrációtartománnyal meg kell ismételni (kivéve akkor, ha a legnagyobb koncentráció megegyezik az oldhatósági határral vagy az előírt maximális határkoncentrációval, például 100 mg/l-rel).

29. Az egyes vizsgálatok mellett kontrolltenyészeteket is kell vizsgálni a vizsgálati edényekével megegyező táptalaj, levél- és telepszám, környezeti körülmények és eljárások alkalmazásával, de a vizsgált vegyi anyag nélkül. Segédoldószer vagy -diszpergálószer alkalmazása esetén egy további kontrolltenyészet is szükséges, amelyben az oldó- vagy diszpergálószer azonos koncentrációban van jelen, mint a vizsgálati edényekben. Legalább a koncentrációnként alkalmazott edényszámmal megegyező, ideális esetben kétszer annyi ismétlést (illetőleg szükség szerint oldószeres edényt) kell alkalmazni.

30. Ha nem kívánjuk meghatározni az NOEC értékét, a vizsgálati terv módosítható oly módon, hogy több koncentrációt, de koncentrációnként kevesebb ismétlést tartalmazzon. A kontroll ismétlések száma azonban ilyenkor is legalább három legyen.

Expozíció

31. Kettő–négy látható levélből álló telepeket a kiindulási tenyészetből csíramentesen a kísérleti edényekbe helyezünk, véletlenszerűen elosztva. A kísérleti edényekbe egyenként összesen 9–12 levél kerüljön. Minden kísérleti edényben azonos számú levél és telep legyen. A módszer alkalmazása és a körvizsgálat során szerzett tapasztalatok azt mutatják, hogy a készítmények közötti, a növekedési sebesség alapján meghatározott növekedésgátlás 4–7 %-os értékének (a szaporulat alapján meghatározott növekedésgátlás 10–15 %-os értékének) megfelelő nagyságú növekedéskülönbség kimutatásához elegendő, ha készítményenként három ismétlést és edényenként 9–12 kiindulási levelet alkalmaznak (7).

32. Az inkubátorban a kísérleti edényeket véletlenszerű elrendezésben kell elhelyezni annak érdekében, hogy a fényerő és a hőmérséklet térbeli változatossága minél kisebb hatást gyakoroljon a vizsgálatokra. A megfigyelések végzésekor (vagy gyakrabban) az edényeket véletlenszerűen vagy blokkonkénti kiosztási terv alapján át kell rendezni.

33. Ha az előzetesen elvégzett stabilitásvizsgálatok azt jelzik, hogy a vizsgált anyag koncentrációja a vizsgálat időtartama (7 nap) alatt nem tartható fenn (azaz a mért koncentráció a kezdeti mért koncentráció 80 %-a alá csökken), akkor félstatikus vizsgálatot ajánlatos végezni. Ennek keretében a telepeket a vizsgálat során legalább két alkalommal (a 3. és az 5. napon) friss vizsgálati és kontrolloldatokba kell helyezni. A friss oldatba helyezés gyakorisága a vizsgált vegyi anyag stabilitásától függ; nagymértékben instabil vagy illékony vegyi anyagok esetén a közel állandó koncentráció fenntartása gyakoribb oldatcserét igényelhet. Bizonyos esetekben állandó áramlású vizsgálatot célszerű végezni (8)(10).

34. Ez az eljárás nem tartalmazza a levélre történő felvitellel (permetezéssel) megvalósuló expozíciót; erről lásd a (11) irodalmat.

Inkubációs körülmények

35. Folyamatos meleg- vagy hidegfehér fluoreszcens megvilágítást alkalmazzunk oly módon, hogy a fotoszintetikusan aktív sugárzásban (400–700 nm), a fényforrástól a *Lemna*-levelekkel megegyező távolságban lévő pontokban mért fényerő a 85–135 $\mu E/m^2s$ tartományban előzetesen felvett értéknek feleljen meg (ez 6 500–10 000 lux értéket jelent). A vizsgálat területén a fényerő az előzetesen felvett értéktől legfeljebb ± 15 %-kal térhet el. A fényerő érzékelésére és mérésére szolgáló módszer, különösen pedig a fényérzékelő befolyásolja a mért értéket. A gömbérzékelők (amelyek a mérési sík

▼M6

alatt és felett tetszőleges irányból érkező fény mérésére alkalmasak) és a „koszinuszos” érzékelők (amelyek csak a mérési sík felett tetszőleges irányból érkező fény mérésére alkalmasak) előnyben részesítendők az egytengelyű érzékelőkkel szemben, mert a jelen módszerben előírt többpontos fényforrás esetén nagyobb értékeket szolgáltatnak.

36. A vizsgálati edényekben a hőmérséklet 24 ± 2 °C legyen. A vizsgálat során a kontrolltenyészet tápoldatának pH-értéke nem növekedhet 1,5-nél nagyobb mértékben. Az 1,5-nél nagyobb eltérés ugyanakkor nem teszi érvénytelenné a vizsgálatot, ha kimutatható, hogy az érvényességi feltételek teljesülnek. A pH-érték eltolódása egyes különleges esetekben, például instabil vegyi anyag vagy fém vizsgálata esetén fokozott körültekintést tesz szükségessé. További iránymutatást a (8) irodalom tartalmaz.

Időtartam

37. A vizsgálat a növények vizsgálati edényekbe helyezése után 7 nappal fejeződik be.

Mérések és analitikai vizsgálatok

38. A vizsgálat kezdetén meg kell számlálni a vizsgálati edényekben lévő leveleket, és az értéket fel kell jegyezni a mérési jegyzőkönyvben; a számlálás során ügyelni kell arra, hogy a kiálló, vizuálisan elkülönülő leveleket vegyük figyelembe. A szabályszerűnek vagy rendellenesnek tűnő levelek számát a vizsgálat kezdetén, az expozíció időtartama alatt legalább háromnaponta (azaz a hét nap során legalább kétszer), valamint a vizsgálat végén kell meghatározni. Fel kell jegyezni a növények fejlődésében beálló változásokat, például a levélméret vagy a megjelenés változásait, a nekrózisra, a klorózisra vagy a púposságra utaló jeleket, a telepek felbomlását vagy az úszóképesség megszűnését, a gyökerek hosszának vagy megjelenésének megváltozását. Fel kell továbbá jegyezni a vizsgálati oldat jellegzetességeit (például oldatlan anyag jelenléte, algaképződés a vizsgálati edényben) is.

39. A vizsgálat során a levélszám mellett a vizsgált vegyi anyagnak a következő mérési változók közül legalább egy továbbira gyakorolt hatását is meg kell határozni:

i. a levelek összterülete,

ii. száraz tömeg,

iii. nedves tömeg.

40. A levelek összterülete azért előnyös mérési változó, mert a vizsgálat kezdetén, folyamán és végén minden vizsgálati és kontrolltenyészetre külön-külön meghatározható. A száraz és a nedves tömeget a vizsgálat elején a vizsgálatban alkalmazandó kiindulási tenyészet szempontjából reprezentatív mintán, majd a vizsgálat végén az egyes vizsgálati és kontrolltenyészetek növényanyagán kell meghatározni. Ha a levélterületet nem mérjük, a száraz tömeg mérését előnyben kell részesíteni a nedves tömeg mérésével szemben.

41. A levelek összterülete, a száraz tömeg és a nedves tömeg a következőképpen határozható meg:

i. *A levelek összterülete:* A telepekben előforduló levelek összterülete meghatározható képelemzés segítségével. Videokamerával (például az edényt világító testre helyezve) rögzíthetők a vizsgálati edény és a növények körvonalai, majd a kiadódó kép digitalizálható. Ismert területű síkidomokhoz hasonlítva meghatározható a vizsgálati edényekben lévő levelek összterülete. Kellő gondossággal ki kell küszöbölni a vizsgálati edény pereme miatti zavarás hatását. Másik, munkaigényesebb lehetőség, ha a vizsgálati edényeket és a növényeket lefényképezzük, a kiadódó körvonalak mentén kivágjuk az alakokat, majd levélterület-elemzővel vagy milliméterpapíron meghatározzuk a levélterületet. Egyéb technikák (például a papírból kivágott terület egységnyi területű idomokhoz hasonlítása a tömegek összevetése alapján) ugyancsak megoldást jelenthetnek.

▼M6

ii. *Száraz tömeg:* A telepeket összegyűjtjük a vizsgálati edényekből, desztillált vagy ionmentesített vízzel leöblítjük őket, leitatjuk a felesleges vizet, és a telepeket 60 °C-on tömegállandóságig hevítjük. A kapcsolódó gyökereket nem távolítjuk el. A száraz tömeget legalább 0,1 mg pontossággal kell kifejezni.

iii. *Nedves tömeg:* A telepeket előzetesen megmért tömegű, kerek aljukon kis (1 mm-es) lyukakkal ellátott polisztirol (vagy más kémiailag semleges anyagból készült) csövekbe helyezzük. A csöveket ezt követően 3 000 1/perc fordulatszámon, szobahőmérsékleten 10 percig centrifugáljuk. Megmérjük a most már szárított telepeket tartalmazó csövek tömegét, és a nedves tömeget az üres csövek tömegének levonásával nyerjük.

A mérések és az analitikai vizsgálatok gyakorisága

42. Statikus vizsgálat esetén a vizsgálat elején és végén megmérjük az egyes készítmények pH-értékét. Félstatikus vizsgálat esetén a pH-értéket minden oldatcsere alkalmával meghatározzuk mind a friss, mind az elhasznált oldaton.

43. A fényerőt a növesztőkamrában, az inkubátorban vagy a vizsgálati helyiségben a fényforrástól a *Lemna*-levelekkel megegyező távolságban elhelyezkedő pontokban mérjük. Fényerőt a vizsgálat során legalább egyszer kell mérni. A növesztőkamrában, az inkubátorban vagy a vizsgálati helyiségben azonos körülmények között külön erre a célra tartott edényben legalább naponta mérjük a tápoldat hőmérsékletét.

44. A vizsgálat során alkalmas időközönként meg kell határozni a vizsgált vegyi anyag koncentrációját. Statikus vizsgálat esetén a koncentrációt legalább a vizsgálat elején és végén kell meghatározni.

45. Félstatikus vizsgálat esetén, ha a vizsgált vegyi anyag koncentrációja várhatóan nem marad a névleges koncentráció ± 20 %-os környezetében, akkor minden friss vizsgálati oldatot elkészítésekor, továbbá minden lecserélt oldatot analitikai vizsgálatnak kell alávetni (lásd a 33. pontot). Olyan vizsgálatok esetén ugyanakkor, amelyekben a vizsgált vegyi anyag mért kezdeti koncentrációja ugyan nem a névleges koncentráció ±20 %-os környezetében van, de adatokkal kellően bizonyítható, hogy a kezdeti koncentrációk megismételhetők és stabilak (azaz a kezdeti koncentráció 80–120 %-os környezetében vannak), akkor az analitikai vizsgálatokat elegendő csak a legkisebb és a legnagyobb vizsgálati koncentráción elvégezni. Az oldatcsere előtt a vizsgált vegyi anyag koncentrációját minden esetben elegendő vizsgálati koncentrációnként egy ismétlésen (vagy az edények ismétlésenként egyesített tartalmán) elvégezni.

46. Állandó áramlású vizsgálat esetén a félstatikus vizsgálathoz hasonló rendben, így a vizsgálat elején, felénél és végén kell mintákat venni, de ilyenkor nincs értelme az „elhasznált” oldat vizsgálatának. Átfolyásos vizsgálat esetén naponta ellenőrizni kell az oldószer és a vizsgált vegyi anyag vagy a vizsgált vegyi anyag törzsoldata adagolási sebességét.

47. Ha kimutatható, hogy a vizsgált vegyi anyag koncentrációját a vizsgálat időtartama alatt sikerült a névleges vagy a mért kezdeti koncentráció ± 20 %-os környezetében tartani, akkor az eredmények a névleges vagy mért kezdeti értékek alapján elemezhetők. Ha a névleges vagy a mért kezdeti koncentrációtól való eltérés meghaladja a ± 20 %-ot, akkor az eredményeket az expozíció idején érvényes koncentrációértékek mértani középértéke vagy a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának csökkenését leíró modellek alapján kell elemezni (8).

▼M6

Határérték-vizsgálat

48. Bizonyos körülmények között, például amikor egy előzetes vizsgálat azt jelzi, hogy a vizsgált vegyi anyagnak nincs toxikus hatása 100 mg/l koncentrációig, vagy a kísérleti oldatban való oldhatósága határáig (amelyik a kettő közül kisebb), határérték-vizsgálat végezhető, amely egy kontrollcsoport és egy kezelt csoport (100 mg/l-es vagy az oldhatósági határral megegyező koncentrációval) szaporodási viselkedésének összehasonlítását jelenti. A vizsgálat során fokozottan ajánlatos elemezni az expozíció koncentrációját. A határérték-vizsgálat során biztosítani kell valamennyi fent leírt vizsgálati körülmény fennállását és érvényességi feltétel teljesülését azzal az eltéréssel, hogy kétszer annyi kezelt ismétlést kell vizsgálni. A kontrollcsoportban és az expozíciónak kitett csoportban tapasztalt növekedés olyan statisztikai próbával (például a Student-féle t-próbával) elemezhető, amely a középértékek összehasonlításán alapul.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Megkettőződési idő

49. A vizsgálat során a levélszám megkettőződéséhez szükséges T_d idő meghatározásához és az erre vonatkozó érvényességi feltétel (lásd a 12. pontot) ellenőrzéséhez a kontrolltenyészetek adataira a következő összefüggést kell alkalmazni:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

ahol μ az 54–55. pont szerint meghatározott átlagos fajlagos növekedési sebesség.

Hatásváltozók

50. A vizsgálat célja annak meghatározása, milyen hatást gyakorol a vizsgált vegyi anyag a *Lemna*-telepek vegetatív növekedésére. Ez a vizsgálati módszer két hatásváltozót tartalmaz, mert a különböző jogrendszerek preferenciái és szabályozási igényei eltérőek. Hogy a vizsgálati eredmények valamennyi jogrendszerben elfogadhatók legyenek, a hatást mindkét alábbi hatásváltozó alapján meg kell határozni.

a) *Átlagos fajlagos növekedési sebesség:* ezt a hatásváltozót a levélszám logaritmusának, valamint egy további mért paraméter (a levelek összterülete, a száraz tömeg vagy a nedves tömeg) logaritmusának napi változása alapján számítjuk a kontrolltenyészetek és az egyes expozíciónak kitett tenyészetek figyelembevételével. Ezt a mennyiséget relatív növekedési sebességnek is nevezik (12);

b) *Szaporulat:* ezt a hatásváltozót a levélszám, valamint egy további mért paraméter (a levelek összterülete, a száraz tömeg vagy a nedves tömeg) értékének változása alapján számítjuk a kontrolltenyészetek és az egyes expozíciónak kitett tenyészetek figyelembevételével.

51. Megjegyzendő, hogy a két hatásváltozó alapján számított toxicitásértékek nem hasonlíthatók egymáshoz, és a vizsgálatok eredményeinek felhasználása során erre a különbségre tekintettel kell lenni. A jelen vizsgálati módszerben előírt vizsgálati körülmények betartása mellett a két számítási eljárás matematikai háttere következtében az átlagos fajlagos növekedési sebességen alapuló EC_x értékek (E_rC_x) általában nagyobbra adódnak, mint a szaporulaton alapuló EC_x értékek (E_yC_x). Ezt az eltérést nem szabad úgy értelmezni, hogy egyik hatásváltozó érzékenyebb lenne a másiknál; egyszerűen arról van szó, hogy a két érték matematikailag mást jelent. Az átlagos fajlagos növekedési sebesség a békalencse korlátozatlan tenyészetekben tanúsított általános exponenciális növekedési mintáján alapul, és a toxicitást a növekedési sebességre kifejtett hatás alapján, a kontrolltenyészetekben tapasztalható növekedési sebesség abszolút nagyságától, a koncentráció-válasz görbe meredekségétől és a vizsgálat időtartamától függetlenül becsli. A szaporulatból

▼M6

származtatott eredmények ezzel szemben mindezektől a változóktól is függnek. Az E_yC_x függ az egyes vizsgálatokban használt békalencsefajok fajlagos szaporodási sebességétől és a legnagyobb fajlagos növekedési sebességétől, ami a fajok, sőt még különböző klónok között is eltérő lehet. Ez a hatásváltozó nem alkalmas az egyes békalencsefajok vagy klónok toxikus hatással szembeni érzékenységében fennálló különbségek megítélésére. Bár tudományos szempontból a toxikus hatást indokoltabb az átlagos fajlagos növekedési sebességből meghatározni, ez a vizsgálati módszer a szaporulaton alapuló toxicitásszámítást is tartalmazza, mert egyes jogrendszerek hatályos jogszabályi követelményei ezt is szükségessé teszik.

52. A toxicitást a levélszám és egy további mérési változó (a levelek összterülete, a száraz tömeg vagy a nedves tömeg) alapján is meg kell határozni, mert bizonyos vegyi anyagok egy másik mérési változót sokkal erősebben befolyásolhatnak, mint a levélszámot. Ez a hatás nem volna kimutatható, ha csak a levélszámból indulnánk ki.

53. A levélszám, valamint a többi feljegyzett mérési változó (a levelek összterülete, a száraz tömeg vagy a nedves tömeg) értékét az egyes mérések alkalmával a vegyi anyag koncentrációértékei szerint táblázatba kell rendezni. A további adatelemzés, azaz az LOEC, az NOEC vagy az EC_x meghatározása során az ismétlések külön-külön vett adataiból, nem pedig az egyes kezelési csoportok középértékéből kell kiindulni.

Átlagos fajlagos növekedési sebesség

54. Az adott időszakhoz tartozó átlagos fajlagos növekedési sebességet a növekedést leíró változók (levélszám, valamint egy további mérési változó: a levelek összterülete, száraz tömeg vagy nedves tömeg) logaritmusának növekedéseként számítjuk a vizsgálati és a kontrolltenyészetek minden egyes példányára külön-külön, a következő összefüggés szerint:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

ahol:

— μ_{i-j}: az átlagos fajlagos növekedési sebesség az „i”-től a „j” időpillanatig

— N_i: a mérési változó értéke a vizsgálati vagy a kontrolltenyészetben az „i” időpillanatban

— N_j: a mérési változó értéke a vizsgálati vagy a kontrolltenyészetben a „j” időpillanatban

— t: az „i”-től „j”-ig terjedő időtartam

Minden kezelt és kontrollcsoportra ki kell számítani egy átlagot a szaporodási sebességre, valamint meg kell becsülni a szórásnégyzetet.

55. Az átlagos fajlagos növekedési sebességet a vizsgálat teljes időtartamára (tehát úgy, hogy a fenti összefüggésben „i” a vizsgálat kezdetét, „j” a vizsgálat végét jelöli) kell meghatározni. Minden egyes vizsgálati koncentrációra és kontrollcsoportra meg kell határozni az átlagos fajlagos növekedési sebesség középértékét és tapasztalati szórásnégyzetét. Emellett (például a növekedési görbék logaritmikus transzformáltjának szemügyre vételével) becslést kell adni a növekedési sebesség szakaszonkénti értékére is annak érdekében, hogy megítélhető legyen a vizsgált vegyi anyag által az expozíciós időszak folyamán kifejtett hatás. Ha a szakaszonkénti növekedési sebesség és az átlagos növekedési sebesség között nagy különbséget tapasztalunk, az azt jelenti, hogy a növekedés mintája erősen eltér az állandó kitevőjű exponenciális növekedéstől és különösen ajánlott a növekedési görbék részletes vizsgálata. Ilyenkor a biztonság javára járunk el, ha az összehasonlítást a legnagyobb gátlás időszakában a vizsgált tenyészetekben és az ugyanebben az időszakban a kontrolltenyészetekben tapasztalt fajlagos növekedési sebesség között végezzük.

56. A növekedési sebesség (I_r) százalékos gátlását ezután vizsgálati koncentrációnként (kezelési csoportonként) a következő összefüggésből kell meghatározni:

▼M6

$$\%\ I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

ahol:

— % I_r: az átlagos fajlagos növekedési sebesség százalékos gátlása

— μ_C: a μ középértéke a kontrollcsoportban

— μ_T: a μ középértéke a vizsgált csoportban

Szaporulat

57. A szaporulatra gyakorolt hatást vizsgálati edényenként, két mérési változó: a levélszám és egy további mérési változó (a levelek összterülete, a száraz tömeg vagy a nedves tömeg) vizsgálat kezdetén és vizsgálat végén mért értékéből számítjuk. A száraz tömeg és a nedves tömeg esetében a kezdeti élőanyagtömeget a vizsgálati edények tartalmának összeállításához (lásd a 20. pontot) használt tételből származó levelekből vett mintán határozzuk meg. Minden egyes vizsgálati koncentráció és kontrollcsoport esetén kiszámítjuk a szaporulat középértékét és tapasztalati szórásnégyzetét. Az egyes kezelési csoportok vonatkozásában a szaporulatra vonatkozó átlagos százalékos gátlás (% I_y) az alábbiak szerint számítható ki:

$$\%\ I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

ahol:

— % I_y: a szaporulat százalékos csökkenése

— b_C: az élőanyagtömeg végső értéke és kiindulási értéke közötti különbség a kontrollcsoportban

— b_T: az élőanyagtömeg végső értéke és kiindulási értéke közötti különbség a vizsgált csoportban

A koncentráció-válasz görbék elkészítése

58. El kell készíteni a hatásváltozóhoz tartozó átlagos százalékos gátlás értékét (az 56., illetve az 57. pontban bemutatottak szerint számított I_r vagy I_y értéket) a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának logaritmusa függvényében ábrázoló koncentráció-válasz görbéket.

Az EC_x becslése

59. Az EC_x (például EC_{50}) becslését mind az átlagos fajlagos növekedési sebesség (E_rC_x), mind a szaporulat (E_yC_x) alapján el kell végezni, amelyeket viszont a levélszámból és egy további mérési változóból (levelek összterülete, száraz tömeg vagy nedves tömeg) egyaránt ki kell számítani. Ez azért szükséges, mert egyes vizsgált vegyi anyagok a levélszámra és a második mérési változóra eltérő hatást gyakorolnak. Ennek megfelelően tehát minden x gátlási szinthez négy EC_x toxicitási paramétert állítunk elő: E_rC_x (levélszám); E_rC_x (levelek összterülete, száraz tömeg vagy nedves tömeg); E_yC_x (levélszám); and E_yC_x (levelek összterülete, száraz tömeg vagy nedves tömeg).

Statisztikai eljárások

60. A statisztikai számítások célja, hogy regressziószámítással kvantitatív koncentráció-válasz összefüggést állítsunk elő. Lehetőség van arra, hogy a hatásadatok – például probit-, logit- vagy Weibull-modell (13) szerinti – linearizációs transzformálását követően súlyozott lineáris regressziót végezzünk, de előnyösebb inkább nemlineáris regressziót alkalmazni, mert ez jobban kezeli az adatok elkerülhetetlen irregularitását és a sima eloszlástól való eltérést. A nulla és a teljes gátlás környezetében az irregularitást a transzformáció felnagyíthatja, ami a számítás szempontjából előnytelen (13). Megjegyzendő, hogy a probit-, logit- vagy Weibull-transzformáltat alkalmazó szokásos számítási módszerek elsősorban kvantált (például mortalitási vagy túlélési) adatok

▼M6

feldolgozására alkalmasak, így módosítást igényelnek, ha a növekedési sebességre vagy a szaporulatra kívánjuk őket alkalmazni. Az EC_x-értékek folytonos adatokból való számítására alkalmas módszereket a (14), (15) és (16) irodalom ismertet.

61. Az EC_x értékek pontbecsléseinek kiszámításához a koncentráció-válasz összefüggést kell használni minden elemzendő hatásváltozóra. Ha lehetséges, meg kell határozni az egyes becslések 95 %-os konfidenciahatárát. A hatásadatok regressziós modellhez illeszkedésének jóságát grafikus vagy statisztikai módszerrel kell megállapítani. A regressziószámítást az egyes vizsgálati edényeken nyert értékekkel, nem pedig a vizsgálati csoportok középértékével kell elvégezni.

62. Ha a rendelkezésre álló regressziós modellek/módszerek nem alkalmasak a konkrét adatok elemzésére, az EC_{50}-re vonatkozó becsléseket és a konfidenciahatárokat „bootstrap” módszerrel együtt alkalmazott lineáris interpolációval (17) is előállíthatjuk.

63. Az LOEC, és így az NOEC becsült értékének előállítása érdekében varianciaanalízis (ANOVA) segítségével összevetjük az egyes készítményekhez tartozó középértékeket. Az egyes koncentrációkhoz tartozó középértékeket ezután alkalmasan megválasztott többszörös összehasonlító módszerrel vagy trendpróbával a kontrollcsoporton nyert középértékhez hasonlítjuk. Hasznos lehet a Dunnett- és a Williams-próba alkalmazása (18)(19)(20)(21). Lényeges ellenőrizni, hogy fennáll-e az ANOVA-nak a szórásnégyzetek homogenitására vonatkozó feltevése. Ezt az ellenőrzést grafikusan vagy formális próbával (22) végezhetjük. A Levene- és Bartlett-féle próbák megfelelőek ehhez. A szórásnégyzetek homogenitására vonatkozó feltevés nem teljesülése gyakran kiküszöbölhető az adatok logaritmikus transzformálásával. Ha a szórásnégyzetek heterogenitása túlságosan szélsőségesnek bizonyul, és transzformációval nem javítható, akkor célszerű megfontolni például a lépésenkénti Jonkheere-trendpróba alkalmazását. Az NOEC meghatározásához további útmutatást ad a (16) irodalom.

64. Az újabb keletű tudományos eredmények az NOEC-koncepció elhagyásának ajánlásához és az EC_x regresszión alapuló pontbecsléssel történő meghatározásával való helyettesítéséhez vezettek. Ehhez a *Lemna*-vizsgálathoz még nem állapítottak meg megfelelő x értéket. A 10–20 %-os tartomány azonban megfelelőnek tűnik (a választott hatásváltozótól függően), és célszerű mind az EC_{10}-et, mind az EC_{20}-at megadni a mérési jegyzőkönyvben.

Jelentéstétel

65. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— fizikai jelleg és fizikokémiai tulajdonságok, vízben való oldhatósági határ;

— kémiai azonosító adatok (pl. CAS-szám), tisztaság (szennyeződések).

A vizsgálathoz felhasznált faj:

— tudományos név, klón (ha ismert) és eredet.

Vizsgálati körülmények:

— alkalmazott vizsgálati eljárás (statikus, félstatikus vagy állandó áramlású);

— a vizsgálat megkezdésének időpontja és időtartama;

— vizsgálati oldat;

— a kísérleti terv ismertetése: vizsgálati edények és fedők, oldattérfogatok, telep- és levélszámok vizsgálati edényenként a vizsgálat megkezdésekor;

— vizsgált koncentrációk (szükség szerint névleges és mért értékek) és az ismétlések száma koncentrációnként;

▼**M6**

— a törzs- és a vizsgálati oldatok elkészítésének módszere, az esetleg alkalmazott oldó- vagy diszpergálószer;

— hőmérséklet a vizsgálat folyamán;

— fényforrás, a fény ereje és homogenitása;

— a vizsgálati és a kontrolloldatok pH-értékei;

— a vizsgált vegyi anyag koncentrációi és az analízis módszere a megfelelő minőségellenőrzési adatokkal együtt (az érvényesség vizsgálata, a szórás vagy az analízis konfidenciahatára);

— a levélszám és a további mérési változók (száraz tömeg, nedves tömeg vagy levélterület) meghatározásának módszere;

— a jelen vizsgálati módszertől való esetleges eltérések.

Eredmények:

— nyers mérési adatok: levélszám és a további mérési változók minden egyes vizsgálati és kontrolltenyészetben minden adatfelvételkor és analízis alkalmával;

— az egyes mérési változók középértékei és szórásai;

— növekedési görbék minden egyes koncentrációra (logaritmikusan transzformált mérési változókkal ajánlott megadni, lásd az 55. pontot);

— megkettőződési idő, illetve növekedési sebesség a kontrolltenyészetben, a levélszám alapján;

— hatásváltozók számított értéke kezelési ismétlésenként, továbbá ismétlésenként a középérték és a szórásnégyzet;

— a koncentráció-válasz összefüggés grafikus formában;

— a hatásváltozók toxikus végpontjainak becslése, pl. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} és a kapcsolódó konfidenciaintervallumok. Ha kiszámítottuk, az LOEC és/vagy az NOEC értéke, továbbá a számításhoz alkalmazott statisztikai módszer;

— ANOVA alkalmazása esetén a hatás kimutatásának mérethatára (például a legkisebb szignifikáns különbség);

— a vizsgálatok során észlelt esetleges növekedésserkentés;

— fitotoxicitásra utaló esetleges látható jelek, valamint a vizsgálati oldatokkal kapcsolatos észrevételek;

— az eredmények szöveges elemzése, beleértve az e vizsgálati módszertől való eltérések vizsgálat kimenetelére gyakorolt hatását.

IRODALOM

(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 – Svéd Szabványügyi Intézet. (1995). Vízminőség. A növekedésgátlás meghatározása (7-d) *Lemna minor*, békalencse. SS 02 82 13. 15pp. (svéd nyelven).

▼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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(9) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet. 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. EPA-600/3–77 108. 1977. szeptember.

(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. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096–1121.

(19) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482–491.

(20) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 519-531.

(22) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

1. függelék

Fogalommeghatározások

E vizsgálati módszerben az alábbi definíciók és rövidítések használatosak:

Élőanyagtömeg: a populációban lévő élő anyag száraz tömege. A vizsgálat során az élőanyagtömeg helyett jellemzően helyettesítő mennyiségeket, például levélszámot vagy levélterületet mérünk, és ezekre a helyettesítő mennyiségekre is „élőanyagtömegként" hivatkozunk.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Klorózis: a levélszövet sárgulása.

Klón: egy adott egyedből ivartalan szaporodással létrejövő szervezet vagy sejt. Az azonos klónhoz tartozó egyedek tehát genetikai szempontból azonosak.

Telep: egymáshoz kapcsolódó anya- és leánylevelek (általában 2–4) összessége. Néha növénynek is nevezik.

EC_x: a vizsgálati oldatban feloldott vizsgált vegyi anyag azon koncentrációja, amely adott expozíciós idő alatt a *Lemna* növekedésének x %-os (például 50 %-os) csökkenését okozza (az expozíciós időt külön meg kell adni, ha eltér a vizsgálat rendes vagy teljes időtartamától). Hogy egyértelmű legyen, hogy az EC értékét a növekedési sebességből vagy a szaporulatból nyertük-e, növekedési sebesség esetén „E_rC"-t, szaporulat esetén „E_yC"-t írunk, majd ezt követően megadjuk a mérési változót, például: E_rC (levélszám).

Állandó áramlású vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek során a vizsgálati oldatot folyamatosan cseréljük.

Levél: a békalencse növény egyetlen különálló, „levélszerű" struktúrája. Ez a szaporodásra képes legkisebb egység (egyed).

Púposság: púpos vagy duzzadt megjelenést mutató levelek.

Növekedés: a vizsgálat ideje alatt a mérési változóban (például a levélszámban, a száraz tömegben, a nedves tömegben vagy a levélterületben) bekövetkező növekedés.

Növekedési sebesség (átlagos fajlagos növekedési sebesség): az élőanyagtömeg logaritmikus növekedése az expozíciós idő alatt.

Észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció (LOEC): az a legkisebb vizsgált koncentráció, amely mellett adott expozíciós idő alatt a vegyi anyag statisztikailag szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) csökkenti a növekedést a kontrolltenyészethez képest. Az LOEC felett ugyanakkor minden koncentrációnak legalább akkora káros hatást kell eredményeznie, mint amelyet az LOEC okoz. Ha ez a két feltétel nem elégíthető ki, az LOEC (és így az NOEC) megválasztását részletesen indokolni kell.

Mérési változók: minden olyan változó, amelyet a vizsgálat végpontjának egy vagy több különböző hatásváltozó segítségével történő kifejezése érdekében mérünk. Ebben az eljárásban mérési változó a levélszám, a levélterület, a nedves tömeg és a száraz tömeg.

Monokultúra: egyetlen növényfajból álló tenyészet.

Nekrózis: elhalt (például fehér vagy vízzel átitatott) levélszövet.

Észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC): az a vizsgált koncentráció, amely közvetlenül az LOEC alatt helyezkedik el.

Fenotípus: az élőlény észlelhető, génjei és a környezet kölcsönhatása által meghatározott jellemzői.

Hatásváltozók: a toxikus hatás becslésére szolgáló, az élőanyagtömeget leíró mérési változókból különböző számítási módszerekkel származtatott változók. Ebben az vizsgálati módszerben hatásváltozó a növekedési sebesség és a szaporulat, amelyeket a levélszámból, a levélterületből, a nedves tömegből és a száraz tömegből mint mérési változókból származtatunk.

▼**M6**

Félstatikus (oldatcserés) vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek során a vizsgálati oldatot bizonyos időközönként lecseréljük.

Statikus vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek során a vizsgálati oldatot nem cseréljük le.

Vizsgált vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszerrel vizsgált anyag vagy keverék.

A vizsgálat végpontja: az az általános jellemző, amelyre a vizsgálat irányul, és amely a vizsgált vegyi anyag hatására a kontrolltenyészethez képest megváltozik. Ebben az vizsgálati módszerben a vizsgálat végpontja a növekedésgátlás, amely különböző, egy vagy több mérési változóból származtatott hatásváltozók segítségével fejezhető ki.

Vizsgálati oldat: az a teljes, szintetikus tápoldat, amelyben a vizsgált növények a vizsgált vegyi anyag jelenlétében növekednek. A vizsgált vegyi anyag általában oldott formában van jelen a vizsgálati oldatban.

Szaporulat: az élőanyagtömeget leíró mérési változó értéke az expozíciós idő végén, mínusz ugyanezen változó értéke az expozíciós idő kezdetén.

▼M6

2. függelék

A *Lemna* nemzetség leírása

A *Lemna* nemzetséghez tartozó, békalencseként közismert vízinövények a *Lemnaceae* családba tartoznak, amelynek négy nemzetsége számos világszerte elterjedt fajt felölel. Különböző megjelenésüket és rendszertanukat a szakirodalom kimerítően ismerteti (1)(2). A *Lemna gibba* és a *L. minor* a mérsékelt éghajlati övezet jellegzetes képviselői; a toxicitási vizsgálatokban többnyire ezeket alkalmazzák. Mindkét fajnak úszó vagy alámerülő, korong alakú levelei és nagyon vékony, az egyes levelek alsó felszínének közepéről eredő gyökerei vannak. A *Lemna*-fajok többnyire nem virágzanak, a szaporodás érdekében a növények vegetatív úton új leveleket hoznak létre (3). Az idősebb növényekhez képest a fiatalabbak általában halványabbak, rövidebb gyökereik vannak és két-három, különböző méretű levélből állnak. A *Lemna*-növények kis mérete, egyszerű struktúrája, ivartalan szaporodása és rövid generációs ideje a nemzetség fajait különösen alkalmassá teszi laboratóriumi vizsgálatokra (4)(5).

Mivel az egyes fajok előreláthatóan eltérő mértékben lesznek érzékenyek a különböző behatásokra, az érzékenységet kizárólag fajon belül szabad összehasonlítani.

Példák a vizsgálatokban korábban már alkalmazott *Lemna*-fajokra: Fajonkénti szakirodalmi hivatkozások

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.

Svéd Szabványügyi Intézet (SIS). (1995). Vízminőség. A növekedésgátlás meghatározása (7-d) *Lemna minor*, békalencse. SS 02 82 13. 15pp. (svéd nyelven).

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.

A *Lemna*-fajok beszerzési forrásai

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Telefon: +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
Amerikai Egyesült Államok
phone 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
SVÉDORSZÁG
Telefon: +46 8 674 7240
Fax (+46) 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin Tel.
Németország
e-mail: lemna@uba.de

SZAKIRODALOM

(1) Hillman, W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

▼M6

3. függelék

A törzstenyészet fenntartása

A törzstenyészetek alacsony hőmérsékleteken (4–10 °C) hosszabb ideig átoltás nélkül is fenntarthatók. A *Lemna* tápoldata megegyezhet a vizsgálatok során alkalmazottal, de a törzstenyészetek más, tápanyagokban gazdag oldatban is tarthatók.

Időről időre néhány fiatal, világoszöld növényt csíramentes eljárással friss tápoldatot tartalmazó növesztőedénybe helyezünk. A javasolt hűvösebb körülmények között elegendő lehet akár háromhavonta is átoltást végezni.

Kémiailag tiszta (savval lemosott) és steril üveg növesztőedényeket alkalmazzunk, és a kezelés során biztosítsunk csíramentes körülményeket. A törzskultúra (például algával vagy gombákkal történő) fertőződése esetén meg kell kísérelni a szennyező organizmusok eltávolítását. Algák és a legtöbb más szennyező organizmus esetén ez felületi fertőtlenítéssel valósítható meg. A fertőződött növényanyagból mintát veszünk, és a gyökereket levágjuk. A növényeket ezután tiszta vízben intenzíven megrázzuk, majd 30 másodperc és 5 perc közötti időtartamra 0,5 térfogatszázalékos nátrium-hipoklorit-oldatba merítjük. A növényanyagot ezután steril vízben átöblítjük, majd több részletben friss tápoldatot tartalmazó növesztőedényekbe helyezzük. A kezelés eredményeképpen számos levél elhal, különösen hosszabb expozíciós idő esetén, de a fennmaradók közül néhány általában fertőzésmentes lesz. Ez a tenyészet a későbbiekben újabbak leoltására használható fel.

▼M6

4. függelék

Tápoldatok

L. minor és *L. gibba* esetén eltérő tápoldatot ajánlott alkalmazni. *L. minor* esetén a svéd szabvány (SIS) szerinti tápoldat módosított változatát, míg *L. gibba* esetén a 20X–AAP tápoldatot javasoljuk. Az alábbiakban megadjuk minkét tápoldat összetételét. Ezeknek a tápoldatoknak az elkészítése során laboratóriumi reagenseket vagy analitikai tisztaságú vegyszereket, és ionmentesített vizet kell használni.

Svéd szabvány (SIS) szerinti *Lemna*-tápoldat

— Az I–V. törzsoldatot autoklávozással (120 °C, 15 perc) vagy membránszűréssel (körülbelül 0,2 μm pórusméret) sterilizáljuk.

— A VI. (és szükség esetén a VII.) törzsoldatot kizárólag membránszűréssel sterilizáljuk, autoklávozás nem alkalmazható.

— A steril törzsoldatokat hideg, sötét helyen tároljuk. Az I–V. törzsoldatot hat hónap elteltével ki kell önteni, míg a VI. (és szükség esetén a VII.) törzsoldat eltarthatósági ideje egy hónap.

Törzsoldat száma	Anyag	Koncentráció a törzsoldatban (g/l)	Koncentráció a kész tápoldatban (mg/·l)	Kész tápoldat	
				Elemek	Koncentráció (mg/·l)
I.	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II.	$MgSO_4.7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III.	$CaCl_2.2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV.	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V.	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2.4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4.7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4.5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI.	$FeCl_3.6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA $2H_2O$	0,28	1,4	-	-
VII.	MOPS (puffer)	490	490	-	-

Egy liter SIS szerinti tápoldat elkészítéséhez 900 ml ionmentesített vízhez a következőket adagoljuk:

▼**M6**

— 10 ml az I. törzsoldatból

— 5 ml a II. törzsoldatból

— 5 ml a III. törzsoldatból

— 5 ml a IV. törzsoldatból

— 1 ml az V. törzsoldatból

— 5 ml a VI. törzsoldatból

— 1 ml a VII. törzsoldatból (ha szükséges)*Megjegyzés:* A VII. törzsoldatot (MOPS puffer) bizonyos vizsgált vegyi anyagok esetében kell alkalmazni (lásd a 11.pontot).

A pH-értéket 0,1 vagy 1 mol HCl vagy NaOH hozzáadásával 6,5 ± 0,2 értékre állítjuk, majd a térfogatot ionmentesített víz hozzáadásával egy literre kiegészítjük.

20X–AAP tápoldat

A törzsoldatokat steril desztillált vagy ionmentesített vízzel készítjük.

A steril törzsoldatokat hűvös, sötét helyen tároljuk. Ilyen körülmények között eltarthatósági idejük legalább 6–8 hét.

A 20X–AAP tápoldat előállításához öt, tápanyagokat tartalmazó törzsoldatot (A1., A2., A3., B. és C.) készítünk reagens minőségű vegyületek felhasználásával. A tápoldat előállításához kb. 850 ml ionmentesített vízhez 20 ml-t adunk minden törzsoldatból. A pH-értéket 0,1 vagy 1 mol HCl vagy NaOH hozzáadásával 7,5 ± 0,1 értékre állítjuk, majd a térfogatot ionmentesített víz hozzáadásával egy literre kiegészítjük. Ezután a tápoldatot egy kb. 0,2 μm pórusméretű membránszűrőn át steril edénybe szűrjük.

A vizsgálatok céljára szánt tápoldatot egy-két nappal a felhasználás előtt kell elkészíteni annak érdekében, hogy pH-értékük stabilizálódhasson. A tápoldat pH-értékét felhasználás előtt ellenőrizni kell, és szükség esetén 0,1 vagy 1 mol HCl vagy NaOH hozzáadásával a fentieknek megfelelően újra be kell állítani.

Törzsoldat száma	Anyag	Koncentráció a törzsoldatban (g/•l) (*)	Koncentráció a kész tápoldatban (mg/•l) (*)	Kész tápoldat	
				Elemek	Koncentráció (mg/•l) (*)
A1.	$NaNO_3$	26	510	Na;N	190;84
	$MgCl_2.6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2.2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2.	$MgSO_4.7H_2O$	15	290	S	38,22
A3.	$K_2HPO_4.3H_2.O$	1,4	30	K;P	9,4;3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2.4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3.6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66

▼**M6**

Törzsoldat száma	Anyag	Koncentráció a törzsoldatban (g/•l) (*)	Koncentráció a kész tápoldatban (mg/•l) (*)	Kész tápoldat	
				Elemek	Koncentráció (mg/•l) (*)
	$Na_2EDTA.2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	$CoCl_2.6H_2O$	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	$CuCl_2.2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na;C	220; 43

(*) eltérő előírás hiányában

Megjegyzés: Az elméletileg szükséges hidrogén-karbonát-koncentráció (amely mellett nincs szükség a pH-érték jelentős mértékű utánállítására) 15 mg/l, nem 300 mg/l. A 20X–AAP tápoldattal végzett korábbi vizsgálatok és a jelen iránymutatáshoz kapcsolódó körvizsgálat azonban egyaránt 300 mg/l-en alapult. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.)

STEINBERG-féle tápoldat (az ISO 20079 szerint)

Koncentrációk és törzsoldatok

A módosított Steinberg-féle tápoldatot az ISO 20079 kizárólag *Lemna minor* esetére írja elő (mert a szabvány csak *Lemna minor* alkalmazását engedélyezi), de korábbi vizsgálatok *Lemna gibba* esetén is kedvező eredményekre vezettek.

A tápoldat készítése során reagens vagy analitikai tisztaságú anyagokat és ionmentesített vizet kell alkalmazni.

A tápoldatot elkészíthetjük törzsoldatokból vagy a tízszeres töménységű oldatból, amely maximális oldatkoncentrációt tesz lehetővé kicsapódás nélkül.

1. táblázat

pH-stabilizált (Altenburger szerint módosított) STEINBERG-féle tápoldat

Összetevő		Tápoldat	
Makroelemek	móltömeg	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**

Összetevő		Tápoldat	
Mikroelemek	móltömeg	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
Dinátrium-EDTA-dihidrát	372,24	1 500,00	4,03

2. táblázat

Törzsoldatok (Makroelemek)

1. Makroelemek (50-szeres töménységű)	**g/l**
1. törzsoldat:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
2. törzsoldat:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
3. törzsoldat:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

3. táblázat

Törzsoldatok (Mikroelemek)

2. Mikroelemek (1 000-szeres töménységű)	**mg/l**
4. törzsoldat:	
H_3BO_3	120,0
5. törzsoldat:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
6. törzsoldat:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
7. törzsoldat:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
8. törzsoldat:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
Dinátrium-EDTA-dihidrát	1 500,00

— A 2. és 3., illetve külön a 4–7. törzsoldat egyesíthető (a kívánt koncentrációk figyelembevételével).

▼**M6**

— A hosszabb eltarthatóság érdekében kezeljük a törzsoldatokat autoklávban 121 °C-on 20 percig, vagy végezzünk membránszűréses (0,2 μm) sterilizálást. A 8. törzsoldat esetében fokozottan ajánlott membránszűréses (0,2 μm) sterilizálást végezni.

A végleges koncentrációjú (módosított) STEINBERG-féle tápoldat elkészítése

— A kicsapódás elkerülése érdekében mintegy 900 ml ionmentesített vízhez adjunk az 1., 2. és 3. törzsoldatból (lásd a 2. táblázatot) egyaránt 20 ml-t.

— Az oldathoz adjunk a 4., 5., 6., 7. és 8. törzsoldatból (lásd a 3. táblázatot) egyaránt 1,0 ml-t.

— A pH-érték 5,5 ± 0,2 legyen (ezt az értéket minél kevesebb NaOH-oldat vagy HCl hozzáadásával állítsuk be).

— Víz hozzáadásával egészítsük ki az oldat térfogatát 1 000 ml-re.

— Ha a törzsoldatok sterilizáltak és megfelelő minőségű vizet alkalmazunk, akkor további sterilizálás nem szükséges. Ha a végleges tápoldatot sterilizáljuk, a 8. törzsoldatot az autoklávozás (121 °C-on 20 percig) után kell hozzáadni.

A 10-szeres töménységű (módosított) STEINBERG-féle tápoldat elkészítése ideiglenes tárolásra

— A kicsapódás elkerülése érdekében mintegy 30 ml vízhez adjunk az 1., 2. és 3. törzsoldatból (lásd a 2. táblázatot) egyaránt 20 ml-t.

— Az oldathoz adjunk a 4., 5., 6., 7. és 8. törzsoldatból (lásd a 3. táblázatot) egyaránt 1,0 ml-t. Víz hozzáadásával egészítsük ki az oldat térfogatát 100 ml-re.

— Ha a törzsoldatok sterilizáltak és megfelelő minőségű vizet alkalmazunk, akkor további sterilizálás nem szükséges. Ha a végleges tápoldatot sterilizáljuk, a 8. törzsoldatot az autoklávozás (121 °C-on 20 percig) után kell hozzáadni.

— A (végleges koncentrációjú) tápoldat pH-értéke 5,5±0,2 legyen.

▼M4

C.27. SZENNYEZETT ÜLEDÉKKEL VÉGZETT ÜLEDÉK-VÍZ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT ÁRVASZÚNYOGLÁRVÁKKAL

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 218. vizsgálati iránymutatásában (2004) leírt módszerrel. E vizsgálati módszer célja a kétszárnyúak rendjébe tartozó édesvízi üledéklakó árvaszúnyoglárvák vegyi anyagoknak való tartós kitettsége hatásainak az értékelése. A *Chironomus riparius* és *Chironomus tentans* árvaszúnyog fajokkal végzett toxicitás vizsgálati protokollokon alapul, amelyeket Európában (1)(2)(3) és Észak-Amerikában (4)(5)(6)(7)(8) dolgoztak ki, és körvizsgálatnak vetettek alá (1)(6)(9). Más jól dokumentált árvaszúnyog fajok, például *Chironomus yoshimatsui* (10)(11) is használhatók.

2. A vizsgálati módszer által alkalmazott expozíciós forgatókönyv az üledék szennyezése a vizsgált anyaggal. A megfelelő expozíciós forgatókönyv a vizsgálat tervezett felhasználásától függ. Az üledékszennyezési forgatókönyv az üledékben tartósan jelen lévő vegyi anyagok felhalmozódását hivatott szimulálni. Ennél az expozíciós elrendezésnél a szennyezett üledék egy üledékből és vízből álló vizsgálati elrendezés részét képezi.

3. Az anyagok, amelyek üledéklakó organizmusokra gyakorolt hatását vizsgálni kell, általában hosszú ideig maradnak ebben a környezetben. Az üledéklakó organizmusok többféle módon lehetnek kitéve ezeknek az anyagoknak. Az egyes expozíciós útvonalak viszonylagos fontossága és a teljes toxikus hatás egyes expozíciós útvonalaknak tulajdonítható részének kialakulásához szükséges időtartam az érintett vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól függ. Az erősen adszorbeálódó (például log K_{ow} > 5) vagy az üledékbe kovalens kötéssel beépülő anyagok esetében fontos expozíciós útvonal lehet a szennyezet táplálék megemésztése. Az erősen lipofil anyagok toxicitása alulbecsülésének elkerülése érdekében megfontolandó, hogy a táplálékot a vizsgált anyaggal való szennyezést megelőzően az üledékbe keverjük. Az itt bemutatott vizsgálati módszer a tartós kitettségre épül, amely azt a célt szolgálja, hogy valamennyi lehetséges expozíciós útvonal figyelembe vehető legyen. A vizsgálat időtartama a *C. riparius* és a *C. yoshimatsui* esetében 20–28 nap, a *C. tentans* esetében 28–65 nap. Ha egy meghatározott célra – például egy instabil vegyület hatásainak a vizsgálatára – rövid távú adatok kellenek, a felesleges ismétlések tíz nap után eltávolíthatók.

4. A mért végpontok a kikelt kifejlett példányok száma és a kikeléshez szükséges idő. Ha kiegészítő rövid távú adatokra van szükség, akkor a lárvák túlélésének és fejlődésének mérését csak a tíznapos időszak eltelte után ajánlott megkezdeni, megfelelő számú ismétlést alkalmazva.

5. Mesterséges üledék használata ajánlott. A mesterséges üledék számos előnnyel rendelkezik a természetes üledékkel szemben:

   — a kísérlet változékonysága kisebb, mivel a mesterséges üledék egy reprodukálható „szabványosított közeget” biztosít, és nem kell szennyezésmentes, tiszta üledékforrást keresni,

   — a vizsgálatok bármikor elkezdhetők anélkül, hogy a vizsgálathoz használt üledék szezonális változékonyságát figyelembe kellene venni, és az üledéket nem kell előzetes kezelésnek alávetni a honos fauna eltávolítása végett; a mesterséges üledék alkalmazása a rutinvizsgálatokhoz szükséges mennyiségű üledék terepen történő gyűjtésével kapcsolatos költségeket is csökkenti,

   — a mesterséges üledék alkalmazása lehetővé teszi a különböző anyagok toxicitásának összehasonlítását és ennek megfelelő rangsorolását.

6. A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

▼M4

A VIZSGÁLAT ELVE

7. Első fejlődési szakaszban lévő árvaszúnyoglárvákat teszünk ki a vizsgált vegyi anyag különböző koncentrációinak üledék-víz elrendezésekben. Az üledéket a vizsgált anyaggal szennyezzük, majd első fejlődési szakaszban lévő lárvákat helyezünk a kísérleti edényekbe, amelyekben az üledék és víz koncentrációját előzőleg stabilizáltuk. Az árvaszúnyoglárvák kikelésének és fejlődésének ütemét a vizsgálat végén mérjük. Szükség esetén 10 nap elteltével is mérhetjük a lárvák túlélését és súlyát (megfelelő számú ismétlést alkalmazva). A kapott adatokból regressziós modell segítségével megbecsüljük azt a koncentrációt, amely a kikelésnek vagy a lárvák túlélésének, illetve fejlődésének x %-os csökkenését okozná (például EC_{15}, EC_{50}, stb.), vagy statisztikai hipotézisvizsgálattal meghatározzuk a megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációt, illetve a megfigyelhető hatást okozó legkisebb koncentrációt (NOEC/LOEC). Az utóbbi esetben a hatást okozó értékeket statisztikai vizsgálatok segítségével össze kell hasonlítani a kontroll értékekkel.

A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

8. Ismerni kell a vizsgált anyag vízoldékonyságát, páranyomását, mért vagy számított megoszlását az üledékben, valamint stabilitását vízben és az üledékben. Rendelkezni kell egy megbízható analitikai módszerrel a vizsgált anyag mennyiségi meghatározásához a fedővízben, a pórusvízben és az üledékben, amelynek pontossága és kimutatási határa ismert és dokumentált. Hasznos információ a vizsgált anyag szerkezeti képlete és kémiai tisztasága. Ugyancsak hasznos információ, hogy milyen kémiai folyamatokon megy keresztül a vizsgált anyag (például disszipáció, nem biológiai és biológiai lebomlás, stb.). A vizsgálat elvégzését megnehezítő fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkező anyagok vizsgálatára vonatkozóan a szakirodalom (12) nyújt további tájékoztatást.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

9. A vizsgálati protokoll és a vizsgálati körülmények megbízhatóságának megerősítése céljából rendszeres időközönként érdemes referencia-vegyianyagokkal elvégezni a vizsgálatot. Körvizsgálatokban és validálási vizsgálatokban eredményesen használt mérgező referenciaanyagok például a következők: lindane, trifluralin, pentaklórfenol, kadmium-klorid és a kálium-klorid (1)(2)(5)(6)(13).

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

10. A következő feltételeknek kell teljesülniük ahhoz, hogy a vizsgálat érvényes legyen:

— A lárvák kikelésének aránya a kontroll edényekben legalább 70 % a vizsgálat végén (1)(6).

— A kontroll edényekben 12–23 nappal a behelyezést követően kell megjelenniük a kifejlett C. riparius és C. yoshimatsui példányoknak; a C. tentans esetében ehhez 20–65 nap szükséges.

— A vizsgálat végén mindegyik edényben meg kell mérni a pH-t és az oldott oxigén koncentrációját. Az oxigénkoncentrációnak a levegő alkalmazott hőmérséklet melletti telítettségi értéke (ASV) legalább 60 százalékának kell lennie, a fedővíz pH-értékének pedig minden edényben a 6–9 tartományon belülre kell esnie.

— a víz hőmérséklete legfeljebb ± 1,0 °C-kal változhat. A vízhőmérséklet szabályozásának egyik lehetséges módja, hogy a vizsgálatot állandó hőmérsékletű helyiségben végezzük, amely esetben a helyiség hőmérsékletét megfelelő időközönként ellenőrizni kell.

▼M4

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Vizsgálati edények

11. A vizsgálatot 600 ml-es üvegedényekben végezzük, amelyek átmérője 8 cm. Amennyiben az üledék és a fedővíz megfelelő mélysége biztosított, ettől eltérő edények is alkalmazhatók. Lárvánként 2–3 cm^2 nagyságú üledékfelületet kell biztosítani. Az üledékréteg és a fedővíz mélységének aránya 1:4 legyen. A vizsgálati edényeknek és a vizsgálati elrendezéssel érintkező egyéb készülékeknek teljes mértékben üvegből vagy más kémiailag semleges anyagból (például teflon) kell készülniük.

A fajok kiválasztása

12. A vizsgálatot lehetőleg a *Chironomus riparius* fajjal végezzük. Chironomus tentans is alkalmazható, de nehezebben kezelhető, és hosszabb vizsgálati időszakot igényel. Chironomus yohimatsui szintén használható. A 2. függelékben részletezett tenyésztési módszerek a Chironomus riparius fajra vonatkoznak. A szakirodalomban más fajok – úgymint a Chironomus tentans (4) és a Chironomus yoshimatsui (11) – tenyésztési körülményeire vonatkozó tudnivalók is megtalálhatók. A vizsgálat megkezdése előtt ellenőrzésképpen fajmeghatározást kell végezni, de ha a példányok saját tenyészetből származnak, akkor ezt nem szükséges minden vizsgálat előtt megtenni.

Üledék

13. Lehetőleg mesterséges üledék (más néven formulázott, kevert vagy műüledék) használata ajánlott. Ha azonban mégis természetes üledéket használunk, akkor azt jellemezni kell (legalább a pH-t és a szerves széntartalmat meg kell határozni, de más paraméterek, például a C/N arány és a szemcseszerkezet vizsgálata is ajánlott), és mentesnek kell lennie mindenféle szennyezéstől, valamint az árvaszúnyoggal versengő vagy az azt fogyasztó egyéb organizmusoktól. Az árvaszúnyoglárvákkal végzett toxicitási vizsgálatban való felhasználás előtt ajánlott továbbá a természetes üledéket az elkövetkező vizsgálat során uralkodókkal megegyező körülmények között hét napon keresztül kondicionálni. E vizsgálat során az alábbi, a C.8. vizsgálati módszerben (14) alkalmazott mesterséges talajon alapuló mesterséges üledék alkalmazása ajánlott (1)(15)(16):

a) 4–5 % (száraz tömeg) tőzeg, amelynek pH-ja a lehető legközelebb esik az 5,5–6,0 értékhez; fontos, hogy por alakú, finomra őrölt (részecskeméret ≤ 1 mm) és kizárólag levegőn szárított tőzeget használjunk.

b) 20 % (száraz tömeg) kaolinagyag (lehetőleg 30 % feletti kaolinit tartalommal).

c) 75–76 % (száraz tömeg) kvarchomok (túlnyomó részben finom homok, amely részecskéinek több mint 50 százaléka 50 és 200 μm közötti szemcseméretttel rendelkezik).

d) Annyi ionmentesített víz, amely ahhoz szükséges, hogy végtermékként 30-50 % nedvességtartalmú keveréket kapjunk.

e) A végtermékként kapott üledékkeverék pH-jának 7,0 ± 0,5 értékre történő beállításához szükséges mennyiségű vegytiszta minőségű kalcium-karbonát ($CaCO_3$). A végtermékként kapott keveréknek 2 % (± 0,5 %) szerves széntartalommal kell rendelkeznie, amelyet az a) és c) pont szerinti megfelelő mennyiségű tőzeg és homok hozzáadásával érünk el.

14. A tőzegnek, a kaolinagyagnak és a homoknak ismert forrásból kell származnia. Ellenőrizni kell, hogy az üledék összetevőiben nem fordulnak elő kémiai szennyeződések (például nehézfémek, szerves klórvegyületek, szerves foszforvegyületek, stb.) A mesterséges üledék elkészítésének egy példáját a 3. függelék mutatja be. Száraz összetevők keverése is elfogadott, amennyiben bizonyítható, hogy a fedővíz hozzáadását követően az üledék nem esik szét összetevőire (például a vízben lebegő tőzegrészecskékre), és a tőzeget vagy az üledéket megfelelően kondicionáltuk.

▼M4

Víz

15. Az elfogadható hígítóvíz 2. és 4. függelékben felsorolt kémiai tulajdonságaival rendelkező bármely víz alkalmas a vizsgálathoz. Tenyésztővízként és kísérleti vízként bármely alkalmas víz, természetes víz (felszíni vagy talajvíz), mesterséges víz (lásd a 2. függeléket) vagy klórtalanított csapvíz elfogadható, amelyben az árvaszúnyoglárvák a tenyésztés és a vizsgálat időszaka alatt életben maradnak anélkül, hogy stressz jeleit mutatnák. A vizsgálat kezdetén a vizsgálathoz alkalmazott víz pH-értékének 6 és 9 között kell lennie, keménysége pedig nem haladhatja meg a 400 mg/l $CaCO_3$ értéket. Ennél lágyabb vizet kell azonban alkalmazni akkor, ha gyanítható, hogy a keménységet okozó ionok és a vizsgált anyag között kölcsönhatás alakul ki (és ezért ebben az esetben az Elendt-féle M4 közeg nem alkalmazható). A vizsgálat teljes időtartama alatt ugyanazt a víztípust kell használni. A 4. függelékben felsorolt vízminőségi jellemzőket évente legalább kétszer kell mérni, illetve minden olyan alkalommal, amikor fennáll a gyanúja annak, hogy e jellemzők jelentős mértékben megváltoztak.

Törzsoldatok – szennyezett üledékek

16. A választott koncentrációjú szennyezett üledéket általában úgy készítjük, hogy a vizsgált anyag oldatát közvetlenül az üledékhez adjuk. A vizsgált anyag ionmentesített vízben oldott törzsoldatát hengerszék vagy tápkeverő segítségével vagy kézzel elkeverjük a mesterséges üledékkel. Ha a vizsgált anyag rosszul oldódik vízben, akkor a célnak megfelelő, lehető legkisebb mennyiségű szerves oldószerben (például hexán, aceton vagy kloroform) oldhatjuk. Ezt követően az oldatot vizsgálati edényenként 10 g finom kvarchomokkal elkeverjük. Az oldószert hagyjuk elpárologni, hogy teljes mértékben eltávozzon a homokból; majd a homokot összekeverjük a vizsgálati edényenként szükséges megfelelő mennyiségű üledékkel. A vizsgált anyag oldódásának megkönnyítéséhez, diszpergálásához vagy emulgeálásához csak gyorsan párolgó szer használható. Nem szabad elfelejteni, hogy az üledék elkészítése során a vizsgált anyag és a homok keverékéből származó homokot is figyelembe kell venni (azaz az üledéket kevesebb homokkal kell készíteni). Biztosítani kell az üledékhez adott vizsgált anyag egyenletes eloszlását az üledékben. Szükség esetén részminták analizálásával határozzuk meg a homogenitás fokát.

A VIZSGÁLAT MEGTERVEZÉSE

17. A vizsgálat megtervezése a vizsgálat során alkalmazott koncentrációk számának és osztásközének, az egyes koncentrációkkal használt edények számának, valamint a lárvák edényenkénti számának a megválasztását jelenti. Ideális esetben a vizsgálatot az alábbiakra tekintettel kell megtervezni. Az EC pontnak és a NOEC becslésének, valamint a határérték-vizsgálatnak a megtervezését ismertetjük.

A regressziós analízis megtervezése

18. A vizsgálat során alkalmazott koncentrációknak le kell fedniük a hatáskoncentrációt (például EC_{15}, EC_{50}) és azt a koncentrációtartományt, amelyen belül a vizsgált anyag érdeklődésre számot tartó hatással rendelkezik. A hatáskoncentráció becsléseknek (EC_x) a pontossága és különösképpen az érvényessége általában jobb, ha a hatáskoncentráció a vizsgált koncentrációtartományon belül helyezkedik el. A lehető legkisebb pozitív koncentrációnál jóval alacsonyabb és a legnagyobb koncentrációnál jóval magasabb értékek extrapolálását kerülni kell. Az alkalmazandó koncentrációtartomány kiválasztásához hasznos lehet előzetes behatároló vizsgálatot végezni (lásd 27. bekezdés).

▼M4

19. Az EC_x becsléséhez legalább öt koncentrációt kell vizsgálni, és mindegyik koncentráció esetében három ismétlést kell alkalmazni. A jó modellbecslés lehetővé tétele érdekében minden esetben tanácsos elegendő vizsgálati koncentrációt használni. A rákövetkező koncentráció legfeljebb kétszerese legyen az előzőnek (kivételt képeznek azok az esetek, amikor a dózis-válasz görbe lapos). Az eltérő választ kiváltó vizsgálati koncentrációk számának emelkedése esetén az egyes kezeléseknél alkalmazott ismétlésszám csökkenthető. Az ismétlésszám növelése vagy a vizsgálat során alkalmazott koncentráció intervallum szűkítése általában a konfidencia intervallum csökkenéséhez vezet. A lárvák tíznapos túlélési arányának és fejlődési sebességének a becslése esetén további ismétlések szükségesek.

A NOEC/LOEC becslésének megtervezése

20. A LOEC vagy a NOEC becsléséhez öt koncentrációt kell vizsgálni legalább négy ismétlést alkalmazva úgy, hogy a rákövetkező koncentráció legfeljebb kétszerese legyen az előzőnek. Az ismétlések számának elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy a kontrollhoz viszonyított 20 %-os különbséget 5 %-os szignifikancia-szint (p = 0,05) mellett megfelelő valószínűséggel kimutasson egy statisztikai próba. A fejlődési ütem esetében általában varianciaanalízist (ANOVA), például Dunnett vagy Williams próbát (17)(18)(19)(20) lehet alkalmazni. Ha a kikelési arányt vizsgáljuk, akkor a Cochran-Armitage, a Fisher-féle egzakt (Bonferroni-féle korrekcióval) vagy a Mantel-Haenszel próbát használhatjuk.

Határérték-vizsgálat

21. Határérték-vizsgálatot akkor lehet végezni (egy vizsgálati és egy kontroll koncentrációval), ha az előzetes behatároló vizsgálat során nem voltak megfigyelhető hatások. A határérték-vizsgálat célja annak a koncentrációnak a meghatározása, amely elég nagy ahhoz, hogy az elvégzett vizsgálat lehetővé tegye a döntéshozók számára a vizsgált anyag lehetséges toxikus hatásainak a kizárását, és annak a határértéknek a megállapítását, amelyen túli koncentrációknak az előfordulása semmilyen esetben sem várható. Az ajánlott koncentráció 1 000 mg/kg (száraz tömeg). Általában mind a kezelés, mind a kontroll esetében legalább hat ismétlés szükséges. Bizonyítni kell, hogy a kontrollhoz viszonyított 20 %-os különbséget 5 %-os szignifikancia-szint (p = 0,05) mellett megfelelő valószínűséggel képes kimutatni egy statisztikai próba. Metrikus válasz (fejlődési ütem és súly) esetén alkalmas statisztikai módszer a t-próba, ha az adatok az alkalmazási feltételeknek (normalitás, szóráshomogenitás) megfelelnek. Ha a feltételek nem teljesülnek, akkor a nem egyenlő szórásnégyzeteket feltételező t-próba vagy egy nemparaméteres próba, például a Wilcoxon-Mann-Whithey próba alkalmazható. A kikelési arány esetében a Fisher-féle egzakt próba a megfelelő.

ELJÁRÁS

Expozíciós körülmények

A szennyezett üledék – víz elrendezés előállítása

22. Az üledék vizsgált anyaggal való szennyezését a „C.8: Toxicitás földigilisztákra” című vizsgálati módszernél leírt eljárás szerint ajánlott elvégezni (14). A szennyezett üledéket elhelyezzük az edényekben, majd felöntjük vízzel úgy, hogy az üledék és a fedővíz mennyiségének az aránya 1:4 legyen (lásd a 11. és a 15. bekezdést). Az üledékrétegnek 1,5–3 cm mélynek kell lennie. Annak elkerülése érdekében, hogy a vizsgálathoz használt víz hozzáadása során az üledék összetevőire essen szét, és a finom anyag a vízrétegben felkavarodjon, az üledéket letakarhatjuk egy műanyag lappal, miközben a vizet ráöntjük, amelyet közvetlenül a felöntést követően eltávolítunk. Erre a célra más eszközök is alkalmasak lehetnek.

23. A vizsgálati edényeket le kell fedni (például üveglappal). Az eredeti vízszint fenntartása érdekében a vizsgálat során pótoljuk az elpárolgott vizet, ha szükséges. A sófelhalmozódás elkerülése végett desztillált vagy ionmentesített vizet használjunk.

▼M4

Stabilizálódás

24. A vízzel fedett szennyezett üledék előállítását követően hagyjuk, hogy a vizsgált anyag a vízfázisból az üledékbe kerüljön, és abban eloszoljon (3)(4)(6)(13). Ez lehetőleg a vizsgálat során alkalmazottal megegyező hőmérsékleti és levegőztetési viszonyok mellett történjen. Az ekvilibrációs idő üledék és vegyi anyag specifikus, tartama óráktól napokig terjedhet, de ritka esetekben több (4–5) hetet is igénybe vehet. Mivel ez alatt az idő alatt számos vegyi anyag lebomolhat, az egyensúlyi állapot beálltának megvárása helyett 48 órás ekvilibrációs időszak alkalmazása ajánlott. Ezen ekvilibrációs idő elteltével mérjük meg a vizsgált anyagnak legalább a legnagyobb és a legalacsonyabb koncentrációját a fedővízben, a pórusvízben és az üledékben (38. bekezdés). Ezek a vizsgált anyagra vonatkozó analitikai meghatározások lehetővé teszik a tömegegyensúly kiszámítását és az eredmények mért koncentrációk alapján történő kifejezését.

A vizsgálathoz használt organizmusok hozzáadása

25. A vizsgálathoz használt organizmusok vizsgálati edényekbe történő behelyezése előtt négy-öt nappal helyezzük a tenyészetből gyűjtött petecsomókat tenyésztőközeget tartalmazó kisméretű edényekbe. A törzstenyészetből vett vagy frissen készített tenyésztőközeg egyaránt használható. Ez utóbbi használata esetén adjunk a tenyésztőközeghez kis mennyiségű táplálékot, például zöldalgát és/vagy finomra őrölt pehely formájú haleledelből készített szuszpenzió szüredékéből néhány cseppet (lásd a 2. függeléket). Csak frissen lerakott petecsomókat szabad használni. A lárvák általában néhány nappal a peterakást követően kezdenek kikelni (a *Chironomus riparius* esetében ez 20 °C-on 2–3 nap, a *Chironomus tentans* és a *Chironomus yoshimatui* esetében pedig 23 °C-on, illetve 25 °C-on 1–4 nap). A lárvák fejlődése négy, egyenként 4–8 napig tartó szakaszra osztható. A vizsgálathoz az első fejlődési szakaszban lévő lárvákat kell gyűjteni (2–3 vagy 1–4 nappal a kikelést követően). Az árvaszúnyoglárvák fejlődési szakaszát a fejszélesség alapján ellenőrizhetjük (6).

26. Mindegyik szennyezett üledéket és vizet tartalmazó vizsgálati edénybe húsz darab, tetszőlegesen kiválasztott lárvát helyezünk egy tompa végű pipetta segítségével. A lárvák vizsgálati edénybe helyezésének ideje alatt állítsuk le a víz levegőztetését, és a behelyezést követő 24 órás időszakon keresztül hagyjuk így (lásd a 25. és a 32. bekezdést). Az alkalmazott vizsgálati tervnek (lásd a 19. és a 20. bekezdést) megfelelően az EC pont becsléséhez legalább 60, a NOEC meghatározásához 80 lárvát használjunk koncentrációnként.

A vizsgálathoz használt koncentrációk

27. A vizsgálat végleges változatában használt koncentrációk meghatározásához hasznos lehet behatároló vizsgálatot végezni. E célra a vizsgált anyag koncentrációinak nagy osztásközű sorozatát használjuk. Annak érdekében, hogy az egy árvaszúnyoglárvára jutó felület megfeleljen a vizsgálat végleges változatában alkalmazandó lárvasűrűségnek, a lárvákat annyi ideig tesszük ki a vizsgált anyag egyes koncentrációinak, amely lehetővé teszi a megfelelő vizsgálati koncentrációk becslését anélkül, hogy ismétlésekre lenne szükség.

28. A vizsgálat végleges változatában használt koncentrációkat a behatároló vizsgálat eredménye alapján határozzuk meg. Legalább öt, a 18–20. bekezdésben leírt módszerrel kiválasztott koncentrációt kell használni.

▼M4

Kontroll edények

29. A vizsgálat során a megfelelő ismétlésszám (lásd a 19–20. bekezdést) biztosításához szükséges számú – a vizsgált anyaggal nem szennyezett üledéket tartalmazó – kontroll edényt kell alkalmazni. Ha a vizsgált anyag bevitele oldószer segítségével történt (lásd a 16. bekezdést), akkor az oldószer hatásainak az ellenőrzése céljára külön kontroll edények szükségesek.

Vizsgálati elrendezés

30. Statikus elrendezést alkalmazunk. Kivételes esetekben – például ha a vízminőségi jellemzők nem felelnek meg a vizsgálathoz használt organizmusoknak, vagy befolyásolják a kémiai egyensúlyt (például túlságosan lecsökken az oldott oxigénszint, túlságosan megnő a kiválasztási termékek koncentrációja, vagy ásványi anyagok lúgozódnak ki az üledékből és hatást gyakorolnak a víz pH-jára és/vagy keménységére) – félstatikus vagy átfolyó rendszerű, a fedővíz szakaszos vagy folyamatos cseréjét lehetővé tévő vizsgálati elrendezések is alkalmazható. Mindazonáltal a fedővíz minőségének javítására szolgáló módszerek, így például a levegőztetés, általában elégségesek, és előnyben részesítendők.

Táplálék

31. A lárvákat lehetőség szerint naponta vagy legalább hetente háromszor kell etetni. Az első 10 napban a fiatal lárvák számára megfelelőnek tűnik naponta lárvánként 0,25–0,5 mg (a *C. yoshimatui* esetében 0,35–0,5 mg) haleledelt adni (amely lehet vizes szuszpenzió vagy finomra őrölt eledel, például Tetra-Min vagy Tetra-Phyll; a részleteket lásd a 2. függelékben). Az idősebb lárváknak valamivel több táplálékra lehet szükségük: a vizsgálat hátralevő részében lárvánként naponta 0,5–1 mg mennyiségnek elegendőnek kell lennie. Gombaképződés vagy a lárvák pusztulása esetén a táplálékadagot valamennyi kísérleti és kontroll edényben csökkenteni kell. Ha a gombák szaporodása nem állítható meg, akkor a vizsgálatot meg kell ismételni. Erősen adszorbeálódó (például log K_{ow} > 5) vagy az üledékbe kovalens kötéssel beépülő anyagok vizsgálata esetén az organizmusok túlélésének és természetes fejlődésének biztosításához szükséges mennyiségű táplálékot még a stabilizálódás időszaka előtt a mesterséges üledékbe keverhetjük. Erre a célra haleledel helyett növényi anyagot használjunk (például 0,5 % (száraz tömeg) finomra őrölt nagy csalán (*Urtica dioica*), fehér eperfa (*Morus alba*), fehér here (*Trifolium repens*), paraj (*Spinacia oleracea*) levelet vagy más növényi anyagot (*Cerophyl* vagy alfa-cellulóz) adhatunk az üledékhez).

Inkubációs körülmények

32. A lárvák vizsgálati edényekbe történő behelyezését követően lehetőleg 24 órán keresztül finoman levegőztessük a fedővizet, és a vizsgálat egész időtartama alatt biztosítsunk gyenge levegőztetést (ügyelve arra, hogy az oldott oxigén koncentrációja ne süllyedjen a levegő telítettségi érték (ASV) 60 százaléka alá. A levegőt az üledékréteg fölött 2–3 cm-rel rögzített üveg Pasteur pipettán keresztül vezessük be (másodpercenként egy vagy néhány buborék). Illékony vegyi anyagok vizsgálata esetén megfontolandó, hogy az üledék-víz elrendezés levegőztetésétől eltekintsünk.

33. A vizsgálatot 20 °C (± 2 °C) állandó hőmérséklet mellett hajtsuk végre. *C. tentans* használata esetén 23 °C, a *C. yoshimatui* esetében pedig 25 °C az ajánlott hőmérséklet (± 2 °C). 16 órás fényperiódust alkalmazzunk, 500–1 000 lux fényintenzitással.

▼M4

Expozíciós időtartam

34. A kitétel a lárvák szennyezett üledéket tartalmazó, illetve kontroll edényekbe történő behelyezésekor veszi kezdetét. A maximális expozíciós időtartam a *C. riparius* és a *C. yoshimatsui* esetében 28 nap, *C. tentans* használata esetén 65 nap. Ha az árvaszúnyogok előbb kikelnek, akkor a vizsgálatot legalább öt nappal azt követően lehet befejezni, hogy a kontroll edényekben az utolsó kifejlett példány megjelent.

Megfigyelések

Kikelés

35. Meg kell határozni a fejlődési időt és a kikelt kifejlett hím és nőstény árvaszúnyogok összes számát. A hímek tollas csápjukról könnyen felismerhetők

36. A kísérleti edényekben legalább hetente háromszor kell ellenőrizni a kontroll edényekben megfigyelhetőhöz képest rendellenesnek értékelhető viselkedést (például üledék elhagyása, szokatlan úszás). A kikelés várható időszaka alatt naponta meg kell számolni a kikelt árvaszúnyogokat. Naponta fel kell jegyezni a kikelt kifejlett egyedek nemét és számát. Az azonosítást követően az árvaszúnyogokat ki lehet engedni az edényekből. A vizsgálat befejezése előtt lerakott petecsomókat dokumentálni kell, és az új lárvák üledékbe kerülésének megelőzése érdekében el kell távolítani. Fel kell jegyezni továbbá a ki nem kelt bábok megfigyelhető számát. A kikelés méréséhez az 5. függelék nyújt útmutatást.

Fejlődés és túlélés

37. Ha a lárvák 10 napos túlélési és fejlődési adatait is be kell mutatni, akkor már a vizsgálat kezdetétől fogva a későbbiekben használható kiegészítő kontroll edényeket kell alkalmazni. Az ezekből származó üledéket átszitáljuk egy 250 μm-es szitán, amelyen a lárvák fennmaradnak. Az elhullás kritériumai a mozdulatlanság, illetve a mechanikai ingerekre adott válasz hiánya. A hiányzó lárvákat is elhullottnak kell tekinteni (a vizsgálat elején elpusztult lárvákat a mikroorganizmusok már lebonthatták). Meghatározzuk a túlélő lárvák edényenkénti (elhullott lárvák maradványai nélküli) száraz tömegét, majd kiszámítjuk az egyedek egy edényre eső átlagos száraz tömegét. A túlélő lárvák fejlődési szakaszának a meghatározása is hasznos; ezt a fejszélesség mérése segítségével tehetjük meg.

Analitikai mérések

A vizsgált anyag koncentrációja

38. A vizsgálat megkezdése (azaz a lárvák behelyezése) előtt kezelésenként legalább egy edényből vegyünk ömlesztett üledék mintát a vizsgált anyag koncentrációjának analitikai meghatározásához az üledékben. A fedővíz, a pórusvíz és az üledék legnagyobb és legkisebb koncentrációnál vett mintáit ajánlott legalább a vizsgálat kezdetén és végén analizálni (lásd a 24. bekezdést). A vizsgált anyag így meghatározott koncentrációja tájékoztatást nyújt a vizsgált anyag viselkedéséről/megoszlásáról a víz-üledék elrendezésben.

39. Ha a vizsgálat közben is végzünk méréseket (például a 7. napon), és az analízishez nagy minták szükségesek, amelyek nem gyűjthetők a kísérleti edényekből anélkül, hogy a mintavétel a vizsgálati elrendezésre hatással lenne, az analitikai meghatározásokat ugyanolyan kezelésnek alávetett (a vizsgálathoz használt organizmusokat is beleértve), de a biológiai megfigyelések céljára nem használt, külön vizsgálati edényekből származó mintákon kell elvégezni

▼M4

40. A pórusvíz elkülönítésére ajánlott módszer például a 10 000 g intenzitással történő centrifugálás 4 °C-on 30 percig. Szűrést is lehet alkalmazni, amennyiben bizonyított, hogy szűrő nem adszorbeálja a vizsgált anyagot. Ha a minta mérete túl kicsi, akkor előfordulhat, hogy nem analizálható a koncentráció a pórusvízben.

Fizikai és kémiai paraméterek

41. A kísérleti edények pH-ját és hőmérsékletét megfelelő módon kell mérni (lásd a 10. bekezdést). A vizsgálat kezdetén és végén a legnagyobb koncentrációnál meg kell mérni a víz keménységét és ammónia tartalmát a kontroll edényekben és egy kísérleti edényben.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVVEZETÉS

Az eredmények kezelése

42. E vizsgálat célja a vizsgált anyag kikelt kifejlett hím és nőstény árvaszúnyogok összes számára és fejlődési ütemére, illetve 10 napos vizsgálat esetében a lárvák túlélésére és súlyára gyakorolt hatásainak a meghatározása. Ha semmi nem utal a nemek statisztikailag eltérő érzékenységére, akkor a hímekre és a nőstényekre vonatkozó eredmények a statisztikai elemzés céljára összevonhatók. Az érzékenység nemek közötti különbségének statisztikai megítélésére például a χ^2-r x 2 próba alkalmazható. Szükség esetén 10 nap elteltével meg kell határozni a lárvák túlélését és az egyedek egy edényre eső átlagos száraz tömegét.

43. A száraz tömeg alapján meghatározott és kifejezett hatáskoncentrációkat lehetőleg a vizsgálat kezdetén mért üledékkoncentrációk alapján kell kiszámítani (lásd a 38. bekezdést).

44. Az EC_{50} vagy bármely más EC_x pontbecsléséhez az edényenkénti statisztikákat valódi ismétléseknek kell tekinteni. Bármely EC_x konfidencia intervallumának a kiszámítása során vagy figyelembe kell venni az edények közötti eltéréseket, vagy ki kell mutatni, hogy az eltérés elhanyagolható mértékű. Ha a modell mérési pontokhoz illesztéséhez a legkisebb négyzetek módszerét használjuk, akkor a szóráshomogenitás javítása érdekében az edényenkénti statisztikákat transzformálni kell. Az EC_x értékeket az eredeti válaszértékekre való visszatranszformálás után kell kiszámítani.

45. Ha a statisztikai elemzés célja a NOEC/LOEC hipotézisvizsgálattal történő meghatározása, az edények közötti eltérések figyelembevételére például hierarchikus varianciaanalízist (nested ANOVA) kell végezni. Alternatívaként ennél robosztusabb próbák (21) is helyénvalók lehetnek olyan esetekben, amikor az ANOVA szokásos alapfeltevései nem teljesülnek.

Kikelési arány

46. A kikelési arányok kvantális adatok, amelyek a Cochran-Armitage próbával elemezhetők a lefelé lépegető eljárást alkalmazva, amennyiben arra számítunk, hogy a dózis-válasz függvény monoton, és az adatok ennek az elvárásnak megfelelnek. Ha ez nem így van, akkor a Fisher-féle egzakt próbát vagy a Mantel-Haenszel próbát használhatjuk a p-értékek Bonferroni- vagy Holm-féle eljárással történő korrekciójával. Ha az ugyanazon koncentrációhoz tartozó ismétlések közötti eltérések bizonyítottan nagyobbak, mint amit a binomiális eloszlás indokolna (amelyet gyakran „extra-binomiális” variációnak neveznek), akkor egy robusztus Cochran-Armitage vagy Fisher-féle egzakt próbát kell alkalmazni, mint amilyet például a (21) javasol.

▼M4

Meg kell határozni az egy edényre jutó kikelt árvaszúnyogok számát (ne), majd el kell osztani a behelyezett lárvák számával (na):

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

ahol:

ER = kikelési arány

n_e = kikelt árvaszúnyogok egy edényre jutó száma

n_a = behelyezett lárvák egy edényre jutó száma

47. Egy másik, legfőképp nagy minták és extra-binomiális variáció esetén alkalmazható lehetőség, hogy a kikelési arányt folyamatos változóként kezeljük, és amennyiben arra számítunk, hogy a dózis-válasz függvény monoton, és ez az elvárás összhangban áll a kapott ER adatokkal, a Williams próbához hasonló eljárást alkalmazunk. Ha a monotonitás nem áll fenn, a Dunnett próbát lehet alkalmazni. A nagy mintát itt úgy értelmezzük, hogy az egy ismétlésre (edényre) jutó kikelt és nem kikelt árvaszúnyogok száma egyaránt meghaladja az ötöt.

48. Az ANOVA módszerek alkalmazásához az ER értékeket először négyzetgyök arkusz-szinusz vagy Freeman-Tukey transzformáció segítségével átalakítjuk, hogy a normálishoz közeli eloszlást kapjunk, és a szórásokat kiegyenlítsük. Abszolút gyakoriságok esetén a Cochran-Armitage, a Fisher-féle egzakt (Bonferroni) vagy a Mantel-Haenszel próbát használhatjuk. A négyzetgyök arkusz-szinusz transzformáció az ER négyzetgyökének az arkusz szinuszát ($\sin^{-1}$) adja.

49. A kikelési arányok meghatározásához regressziós analízissel (vagy például probit (22), logit, Weibull, kereskedelmi forgalomban kapható megfelelő szoftverrel stb.) számítjuk ki az EC_x értékeket. Ha a regressziós analízis alkalmatlannak bizonyul (például kettőnél kevesebb részleges válasz esetén), más nemparaméteres módszert, például mozgóátlag-módszert vagy egyszerű interpolációt használunk.

Fejlődési ütem

50. Az átlagos fejlődési idő a lárvák kísérleti edényekbe történő behelyezésétől (a vizsgálat 0. napjától) az árvaszúnyogok kikeléséig tartó átlagos időtartamot jelenti. (A valódi fejlődési idő kiszámításához figyelembe kell venni a lárvák életkorát a behelyezés időpontjában). A fejlődési ütem a fejlődési idő reciproka (egysége: 1/nap), és a lárvafejlődés egy napra eső részét fejezi ki. Az ilyen jellegű üledék-toxicitási vizsgálatok értékeléséhez inkább a fejlődési ütemet használjuk, mivel kisebb a szórása, homogénebb és a normálishoz közelebb álló eloszlást mutat, mint a fejlődési idő. Ennélfogva a fejlődési ütem hatásosabb paraméteres vizsgálati eljárások alkalmazását teszi lehetővé, mint a fejlődési idő. A folyamatos változónak tekintett fejlődési ütemhez tartozó EC_x értékek becslésére regressziós analízist használunk (például (23), (24)).

51. A következő statisztikai próbákhoz feltételezzük, hogy az x. ellenőrzési napon megfigyelt számú árvaszúnyog az x. nap és az x–1. nap (l = az ellenőrzések közötti intervallum hossza, általában 1 nap) közötti időintervallum közepén kelt ki. Az egy edényre jutó átlagos fejlődési ütemet a következő képlet szerint számítjuk ki:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

ahol:

$\bar{x}$: egy edényre jutó átlagos fejlődési ütem

i: ellenőrzési intervallum indexe

m: ellenőrzési intervallumok maximális száma

f_i: az i ellenőrzési intervallumban kikelt árvaszúnyogok száma

n_e: kikelt árvaszúnyogok száma összesen a kísérlet végén (= $\sum f_i$)

x_i: az i ellenőrzési intervallumban kikelt árvaszúnyogok fejlődési üteme

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

ahol:

day_i: ellenőrzési nap (a behelyezés óta eltelt napok száma)

l_i: az i ellenőrzési intervallum hossza (napokban kifejezve, általában 1 nap)

Vizsgálati jegyzőkönyv

52. A vizsgálati jegyzőkönyvnek legalább a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

— fizikai jelleg és adott esetben a fizikai és kémiai tulajdonságok (vízoldékonyság, páranyomás, talajra (vagy ha rendelkezésre áll, az üledékre) vonatkozó megoszlási hányados, stabilitás vízben, stb.),

— kémiai azonosító adatok (közönséges név, kémiai név, szerkezeti képlet, CAS-szám, stb.,) beleértve a kémiai tisztaságot és a vizsgált anyag mennyiségi meghatározásának analitikai módszerét.

A vizsgálathoz felhasznált faj:

— a vizsgálathoz felhasznált állatok: faj, tudományos elnevezés, az organizmusok származása és tenyésztési körülményei,

— a petecsomók és a lárvák kezelésére vonatkozó információk,

— a vizsgálathoz felhasznált állatok életkora az edényekbe történő behelyezésükkor.

Vizsgálati körülmények:

— az alkalmazott üledék, azaz természetes vagy mesterséges üledék,

— természetes üledék esetén az üledékminta gyűjtésének helye és a mintavételi hely leírása, beleértve lehetőség szerint a szennyezés történetét; jellemzők: pH, szerves széntartalom, C/N arány és szemcseszerkezet (ha indokolt),

— a mesterséges üledék előállítása: összetevők és jellemzők (szerves széntartalom, pH, nedvességtartalom, stb. a vizsgálat kezdetén),

— a vizsgálathoz használt víz előállítása (mesterségesen készített víz esetén) és jellemzői (oxigénkoncentráció, pH, vezetőképesség, keménység, stb. a vizsgálat kezdetén),

— az üledék és a fedővíz mélysége,

— a fedővíz és a pórusvíz mennyisége; a nedves üledék tömege pórusvízzel és pórusvíz nélkül,

▼M4

— vizsgálati edények (anyag és méret),

— az üledékszennyezés módszere: alkalmazott vizsgálati koncentrációk, ismétlésszám és esetlegesen használt oldószer,

— a szennyezett üledék-víz elrendezés stabilizálódása és egyensúlyi fázisa: időtartam és körülmények,

— inkubációs körülmények: hőmérséklet, fényciklus és intenzitás, levegőztetés (gyakoriság és intenzitás),

— a táplálásra vonatkozó információk, beleértve a táplálék típusát, elkészítését, mennyiségét és a táplálás rendjét.

Eredmények:

— a névleges vizsgálati koncentrációk, a mért vizsgálati koncentrációk és a kísérleti edények vizsgált anyag koncentrációjának a meghatározására használt analízisek eredményei,

— a víz minősége a vizsgálati edényekben, azaz pH, hőmérséklet, oldott oxigén, vízkeménység és ammóniatartalom,

— az elpárolgott víz pótlása a vizsgálati edényekben, ha pótoljuk,

— a kikelt hím és nőstény árvaszúnyogok egy edényre és napra eső száma,

— ki nem kelt lárvák egy edényre jutó száma,

— a lárvák egy edényre és – adott esetben – egy fejlődési szakaszra jutó átlagos száraz tömege,

— ismétlésenkénti és vizsgálati koncentrációnkénti százalékos kikelés (hím és nőstény árvaszúnyogok együttesen),

— kikelt kifejlett árvaszúnyogok ismétlésenkénti és kezelési arányonkénti átlagos fejlődési üteme (hím és nőstény árvaszúnyogok együttesen),

— toxicitási végpontok – például EC_x (és a hozzá tartozó konfidencia intervallum), NOEC és/vagy LOEC – becsült értékei, valamint a meghatározásukhoz használt statisztikai módszerek,

— az eredmények szöveges elemzése, beleértve az e vizsgálati módszertől való eltérések vizsgálat kimenetelére gyakorolt hatását.

SZAKIRODALOM

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125–1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼M4

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Kultúra 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) E melléklet C.8. vizsgálati módszere: Toxicitás földigilisztákra.

(15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

(16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096–1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482–491.

(19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103–117.

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510–531.

(21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577–585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485–1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼**M4**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

E vizsgálati módszer alkalmazásában a következő fogalommeghatározások alkalmazandók:

Mesterséges üledék vagy formulázott, kevert vagy műüledék: a természetes üledék fizikai összetevőinek az imitálására használt anyagok keveréke.

Fedővíz: a vizsgálati edényben az üledék felé kerülő víz.

Pórusvíz vagy szemcseközi víz: az üledék és a talaj szemcséi közötti helyet kitöltő víz.

Szennyezett üledék: a vizsgált vegyi anyaggal szennyezett üledék.

Vizsgált vegyi anyag: Bármely, ennek a vizsgálati módszernek az alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

▼M4

2. függelék

Ajánlások a *Chironomus riparius* tenyésztéséhez

1. Az árvaszúnyoglárvákat kristályosító csészékben vagy nagyobb edényekben tenyésztjük. Az edény aljára szórjunk vékony réteg (kb. 5–10 mm) kvarchomokot. A szilikagél (például Merck, cikkszám: 8117) is megfelelő szubsztrátumnak bizonyult (ebből vékonyabb, pár milliméternyi réteg is elegendő). Ezt követően töltsünk néhány centiméternyi megfelelő vizet az edénybe. A vízszint fenntartása és a kiszáradás megelőzése érdekében szükség szerint pótoljuk az elpárolgott vizet. Cserélhetjük is a vizet, ha kell. Biztosítsunk gyenge levegőztetést. A lárvatenyésztő edényeket tartsuk egy megfelelő ketrecben, amelyből a kikelő kifejlett példányok nem tudnak kiszökni. A ketrecben legyen elég hely a kikelt kifejlett példányoknak a mozgásra, mert ellenkező esetben nem fognak párosodni (minimum kb. 30 × 30 × 30 cm).

2. A ketreceket tartsuk szobahőmérsékleten vagy 20 ± 2 °C állandó hőmérsékletű helyiségben, 16 órán keresztül világosban (fényintenzitás kb. 1 000 lux) és 8 órán keresztül sötétben. Dokumentálták, hogy a 60 % RH alatti légnedvesség gátolhatja a szaporodást.

Hígítóvíz

3. Bármilyen alkalmas természetes vagy művíz használható. Általában kútvizet, klórtalanított csapvizet vagy mesterséges közeget (például Elendt-féle M4 vagy M7 közeget, lásd lentebb) használunk. Használat előtt a vizet levegőztetni kell. Szükség esetén cserélhetjük a tenyésztéshez használt vizet. Ehhez a használt vizet öntsük le vagy szívjuk ki a tenyésztő edényekből ügyelve arra, hogy a lárvák által épített lakócsöveket el ne pusztítsuk.

A lárvák táplálása

4. Az árvaszúnyoglárvákat pehely formájú haleledellel (Tetra Min®, Tetra Phyll® vagy hasonló, védett márkájú haltáppal) etessük, amelyből naponta körülbelül 250 mg-ot adjunk minden edényhez porrá őrölve szárazon vagy vizes szuszpenzióban, amelynek az elkészítéséhez 1,0 g pehely formájú haleledelt keverjünk el 20 ml hígítóvízben úgy, hogy homogén keveréket kapjunk. Ebből a készítményből naponta 5 ml-t adjunk minden edényhez (használat előtt felrázandó). Az idősebb lárvák kaphatnak ennél többet.

5. A táplálék mennyiségét a vízminőséghez kell igazítani. Ha a tenyésztőközeg zavarossá válik, akkor csökkenteni kell a mennyiséget. Az adott táplálék mennyiségét szigorú ellenőrzés alatt kell tartani. Ha túl kevés a táplálék, akkor a lárvák a vízrétegbe vándorolnak, ha túl sok, akkor fokozódik a mikrobatevékenység és csökken az oxigénkoncentráció. Mindkét körülmény a fejlődési ütem lassulását okozhatja.

6. Az újonnan létesített tenyésztő edényekhez zöldalga (például *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) sejtek is adhatók.

A kikelt kifejlett példányok táplálása

7. Egyes kísérletek szerint a kikelt kifejlett példányok számára egy telített cukoroldatba mártott vattakorong szolgálhat táplálékként.

▼M4

Kikelés

8. 20 ± 2 °C hőmérsékleten a kifejlett példányok körülbelül 13–15 nap elteltével kezdenek megjelenni a lárvatenyésztő edényekben. A hímek tollas csápjuk alapján könnyen megkülönböztethetők.

Petecsomók

9. Miután a kifejlett példányok megjelentek a tenyésztőketrecben, a lárvatenyésztő edényekben hetente háromszor ellenőrizni kell a lerakott zselatinszerű petecsomókat, amelyeket gondosan el kell távolítani, és át kell helyezni egy tenyésztővíz-mintát tartalmazó kisméretű edénybe. A petecsomókat új tenyészetek létrehozására (például 2–4 petecsomó/edény) vagy toxicitási vizsgálatok céljára használjuk fel.

10. Az első fejlődési szakaszban lévő lárváknak 2–3 napon belül kell kikelniük.

Új tenyészetek létesítése

11. A stabil tenyészetekből hetente vagy – a vizsgálati követelményektől függően – ritkábban friss lárvatenyészetek hozhatók létre, miközben a régebbi edényeket a kifejlett árvaszúnyogok megjelenését követően eltávolítjuk. Ezzel a rendszerrel minimális kezelést igénylő módon biztosítható a kifejlett példányok rendszeres utánpótlása.

A vizsgálathoz használt „M4” és „M7” oldatok előállítása

12. Az „M4” közeg leírása Elendt (1990) munkájában megtalálható. Az „M7” közeg ugyanúgy készül, mint az „M4”, azzal a különbséggel, hogy az 1. táblázatban feltüntetett anyagok koncentrációja az „M7” esetében négyszer alacsonyabb, mint az „M4” készítésekor. Az „M7” közegről szóló publikáció előkészületben van (Elendt, személyes közlés). A vizsgálathoz használt oldatot azért nem Elendt és Bias (1990) szerint kell előállítani, mert a törzsoldatok elkészítéséhez megadott NaSiO3 5 H_2O, NaNO3, KH2PO4 és K2HPO4 koncentrációk nem megfelelők.

Az „M7” közeg előállítása

13. Az (I) törzsoldatok mindegyikét külön kell elkészíteni, majd az (I) törzsoldatokból egy (II) kombinált törzsoldatot készítünk (lásd az 1. táblázatot). Az „M7” közeg előállításához a (II) kombinált törzsoldat 50 ml-ét és az egyes makrotápanyagok törzsoldatainak a 2. táblázatban megadott mennyiségeit ionmentesített vízzel 1 literre hígítjuk. Vitamin-törzsoldatot készítünk, amelyhez három vitamint ionmentesített vízhez adunk a 3. táblázatban meghatározottak szerint, majd röviddel a felhasználás előtt az „M7” közeghez adunk 0,1 ml-t a kombinált vitamin törzsoldatból. (A vitamin-törzsoldatot kis aliquot részekben, fagyasztott állapotban kell tartani). A közeget levegőztetni és stabilizálni kell.

SZAKIRODALOM

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

1. táblázat

Nyomelemek törzsoldatai az M4 és M7 közeghez

(I) törzsoldatok	Ion-mentesített vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	A (II) kombinált törzsoldat előállításához az (I) törzsoldatok következő mennyiségeit (ml) elegyítjük és ionmentesített vízzel 1 literre hígítjuk		Végleges koncentráció a vizsgálathoz használt oldatban (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) Ezeknek az anyagoknak az esetében a fent jelzett módon eltér az M4 és az M7.
(2) Ezeket az oldatokat külön kell elkészíteni, majd összeönteni és azonnal autoklávban kezelni.

2. táblázat

Makrotápanyagok törzsoldatai az M4 és M7 közeghez

	Ion-mentesített vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	Makrotápanyagok törzsoldatainak M4 és M7 közeg előállításához használt mennyisége (ml/l)	Végleges koncentráció a vizsgálathoz használt M4 és M7 oldatban (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

3. táblázat

Vitamin-törzsoldatok az M4 és M7 közeghez. A három vitaminoldatból egyetlen kombinált vitamin-törzsoldatot készítünk

	Ion-mentesített vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	Vitamin- törzsoldat M4 és M7 közeg előállításához használt mennyisége (ml/l)	Végleges koncentráció a vizsgálathoz használt M4 és M7 oldatban (mg/l)
Tiamin-hidroklorid	750	0,1	0,075
Cianokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

SZAKIRODALOM

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Kultúrad in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Kultúra Conditions on LIFE History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼M4

3. függelék

MESTERSÉGES ÜLEDÉK KÉSZÍTÉSE

Az üledék összetétele

A mesterséges üledék összetétele a következő:

Összetevő	Jellemzők	Üledék száraz tömegének %-a
Tőzeg	Tőzegmoha, amelynek pH-ja a lehető legközelebb esik az 5,5-6,0 értékhez, és nem tartalmaz látható növénymaradványokat, finomra őrölve (részecskeméret ≤ 1 mm) és levegőn szárítva	4 - 5
Kvarchomok	Szemcseméret: a részecskék több mint 50 százaléka a 50–200 μm tartományban	75 - 76
Kaolinit agyag	Kaolinit tartalom ≥ 30 %	20
Szerves szén	Tőzeg és homok hozzáadásával beállítva	2 (± 0,5)
Kalcium-karbonát	Porított, vegytiszta $CaCO_3$	0,05 - 0,1
Víz	Vezetőképesség ≤ 10 μS/cm	30 - 50

Elkészítés

A levegőn szárított tőzeget finom porrá őröljük. Nagyteljesítményű homogenizáló készülék segítségével ionmentesített vízzel szuszpenziót készítünk a szükséges mennyiségű tőzegporból. A szuszpenzió pH-ját $CaCO_3$ hozzáadásával beállítjuk 5,5 ± 0,5 értékre. A pH és a mikrobiológiai összetétel stabilizálása végett 20 ± 2 °C hőmérsékleten lassú keveréssel legalább két napig kondicionáljuk a szuszpenziót. Az ezt követően ismét megmért pH-nak 6,0 ± 0,5 értéket kell mutatnia. Ezek után a szuszpenziót összekeverjük a többi összetevővel (homok és kaolinagyag), valamint az ionmentesített vízzel úgy, hogy az üledék száraz tömegének 30–50 százaléka közötti víztartalommal rendelkező, homogén üledéket kapjunk. A végtermékként kapott keverék pH-ját ismételten megmérjük, és szükség esetén $CaCO_3$ hozzáadásával beállítjuk 6,5–7,5 értékre. Az üledékből vett minta alapján meghatározzuk a száraz tömeget és a szerves széntartalmat. Ezt követően az árvaszúnyogokkal végzett toxicitási vizsgálatban való felhasználás előtt ajánlott a mesterséges üledéket hét napig a vizsgálatban használni kívántakkal megegyező körülmények között kondicionálni.

Tárolás

A mesterséges üledék előállításához használt száraz összetevők száraz, hűvös helyen, szobahőmérsékleten tárolhatók. Az összeállított (nedves) üledék a vizsgálatban való felhasználás előtt nem tárolható. Az előállításának záró lépését képező 7 napos kondicionálási időszakot követően azonnal fel kell használni.

SZAKIRODALOM

E melléklet C.8. fejezete: Toxicitás földigilisztákra.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10–20.

▼**M4**

4. függelék

Az elfogadható hígítóvíz kémiai tulajdonságai

Anyag	Koncentráció
Szemcsés anyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 mg/l
Ionizálatlan ammónia	< 1 μg/l
Keménység $CaCO_3$ koncentrációban kifejezve	< 400 mg/l (*)
Maradék klór	< 10 μg/l
Összes szerves foszfort tartalmazó növényvédő szer	< 50 ng/l
Összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer plusz poliklórozott bifenilek	< 50 ng/l
Összes szerves klór	< 25 ng/l

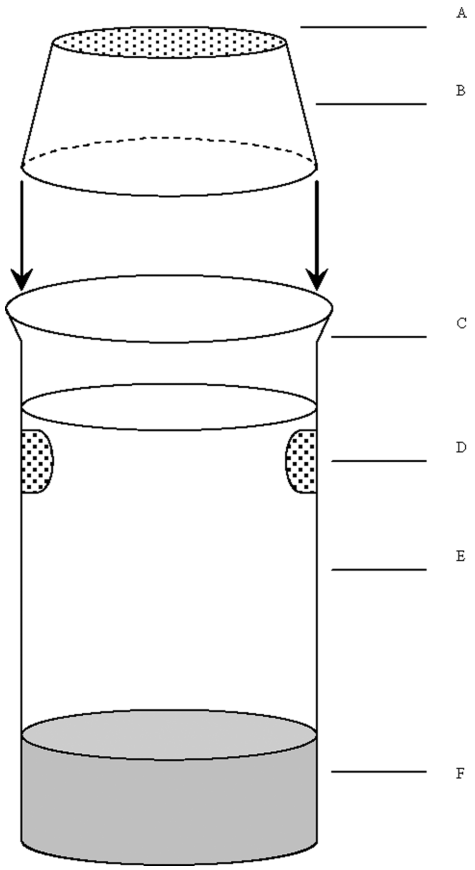
(*) Meg kell azonban jegyezni, hogy ha a keménységet okozó ionok és a vizsgált anyag között gyaníthatóan kölcsönhatás alakul ki, akkor lágyabb vizet kell alkalmazni (és ezért az Elendt-féle M4 közeg ilyen esetben nem alkalmazható).

▼**M4**

5. függelék

Útmutató az árvaszúnyoglárvák kikelésének figyelemmel kíséréséhez

A vizsgálati edényekre csapdákat helyezünk a kikelt példányok számára. A csapdák a 20. naptól a vizsgálat végéig szükségesek. Ezek egy példáját mutatja be az alábbi ábra:



A: nylon háló

B: fejjel lefelé fordított műanyagpohár

C: vizsgálati edény, kiöntő nélkül

D: hálós vízcserélő nyílás

E: víz

F: üledék

▼M4

C.28. SZENNYEZETT VÍZZEL VÉGZETT ÜLEDÉK-VÍZ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT ÁRVASZÚNYOGLÁRVÁKKAL

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 219. vizsgálati iránymutatásában (2004) leírt módszerrel. E vizsgálati módszer célja a kétszárnyúak rendjébe tartozó édesvízi üledéklakó árvaszúnyoglárvák vegyi anyagoknak való tartós kitettsége hatásainak az értékelése. Főként a BBA mesterséges talajjal és vízoszlopban való expozíciós forgatókönyvvel végzett üledék-víz vizsgálati elrendezésre vonatkozó iránymutatásán alapul (1). Figyelembe veszi továbbá a *Chironomus riparius* és *Chironomus tentans* árvaszúnyog fajokkal végzett toxicitás vizsgálati protokollokat, amelyeket Európában és Észak-Amerikában (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) dolgoztak ki, és körvizsgálatnak vetettek alá (1)(6)(9). Más jól dokumentált árvaszúnyog fajok, például *Chironomus yoshimatsui* (10)(11) is használhatók.

2. A vizsgálati módszer által alkalmazott expozíciós forgatókönyv a víz szennyezése. A megfelelő expozíciós forgatókönyv a vizsgálat tervezett felhasználásától függ. A vízoszlopban való expozíción alapuló forgatókönyv a vízoszlop szennyezését foglalja magában, amely a növényvédő szerek permetezéssel történő vízbe jutását hivatott szimulálni, és a pórusvízben mérhető kezdeti csúcskoncentrációkra terjed ki. A vizsgálat időtartamánál hosszabb ideig tartó felhalmozódással járó folyamatok kivételével más típusú expozíciók (többek között a vegyi anyagok kiömlése) esetén is hasznos.

3. Az anyagok, amelyek üledéklakó organizmusokra gyakorolt hatását vizsgálni kell, általában hosszú ideig maradnak ebben a környezetben. Az üledéklakó organizmusok többféle módon lehetnek kitéve ezeknek az anyagoknak. Az egyes expozíciós útvonalak viszonylagos fontossága és a teljes toxikus hatás egyes expozíciós útvonalaknak tulajdonítható részének kialakulásához szükséges időtartam az érintett vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól függ. Az erősen adszorbeálódó (például log K_{ow} > 5) vagy az üledékbe kovalens kötéssel beépülő anyagok esetében fontos expozíciós útvonal lehet a szennyezet táplálék megemésztése. Az erősen lipofil anyagok toxicitása alulbecsülésének elkerülése érdekében megfontolandó, hogy a táplálékot a vizsgált anyaggal való szennyezést megelőzően az üledékbe keverjük. Az itt bemutatott vizsgálati módszer a tartós kitettségre épül, amely azt a célt szolgálja, hogy valamennyi lehetséges expozíciós útvonal figyelembe vehető legyen. A vizsgálat időtartama a *C. riparius* és a *C. yoshimatsui* esetében 20–28 nap, a *C. tentans* esetében 28–65 nap. Ha egy meghatározott célra – például instabil vegyületek hatásainak a vizsgálatára – rövid távú adatok kellenek, a felesleges ismétlések tíz nap után eltávolíthatók.

4. A mért végpontok a kikelt kifejlett példányok száma és a kikeléshez szükséges idő. Ha kiegészítő rövid távú adatokra van szükség, akkor a lárvák túlélésének és fejlődésének mérését csak a tíznapos időszak eltelte után ajánlott megkezdeni, megfelelő számú ismétlést alkalmazva.

5. Mesterséges üledék használata ajánlott. A mesterséges üledék számos előnnyel rendelkezik a természetes üledékkel szemben:

   — a kísérlet változékonysága kisebb, mivel a mesterséges üledék egy reprodukálható „szabványosított közeget” biztosít, és nem kell szennyezésmentes, tiszta üledékforrást keresni,

   — a vizsgálatok bármikor elkezdhetők anélkül, hogy a vizsgálathoz használt üledék szezonális változékonyságát figyelembe kellene venni, és az üledéket nem kell előzetes kezelésnek alávetni a honos fauna eltávolítása végett; a mesterséges üledék alkalmazása a rutinvizsgálatokhoz szükséges mennyiségű üledék terepen történő gyűjtésével kapcsolatos költségeket is csökkenti,

▼M4

— a mesterséges üledék alkalmazása lehetővé teszi a különböző anyagok toxicitásának összehasonlítását és ennek megfelelő rangsorolását: a természetes és a mesterséges üledékkel végzett vizsgálatokból származó toxicitási adatok számos vegyi anyag esetében összehasonlíthatók voltak (2).

6. A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

7. Első fejlődési szakaszban lévő árvaszúnyoglárvákat teszünk ki a vizsgált anyag különböző koncentrációinak üledék-víz elrendezésekben. A vizsgálat kezdetén első fejlődési szakaszban lévő lárvákat helyezünk az üledék-víz elrendezést tartalmazó vizsgálati edényekbe, majd ezt követően a vizsgált anyaggal szennyezzük a vizet. Az árvaszúnyoglárvák kikelésének és fejlődésének ütemét a vizsgálat végén mérjük. Szükség esetén 10 nap elteltével is mérhetjük a lárvák túlélését és súlyát (megfelelő számú ismétlést alkalmazva). A kapott adatokból regressziós modell segítségével megbecsüljük azt a koncentrációt, amely a kikelésnek vagy a lárvák túlélésének, illetve fejlődésének x %-os csökkenését okozná (például EC_{15}, EC_{50}, stb.), vagy statisztikai hipotézisvizsgálattal meghatározzuk a megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációt, illetve a megfigyelhető hatást okozó legkisebb koncentrációt (NOEC/LOEC). Az utóbbi esetben a hatást okozó értékeket statisztikai vizsgálatok segítségével össze kell hasonlítani a kontroll értékekkel.

A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

8. Ismerni kell a vizsgált anyag vízoldékonyságát, páranyomását, mért vagy számított megoszlását az üledékben, valamint stabilitását vízben és az üledékben. Rendelkezni kell egy megbízható analitikai módszerrel a vizsgált anyag mennyiségi meghatározásához a fedővízben, a pórusvízben és az üledékben, amelynek pontossága és kimutatási határa ismert és dokumentált. Hasznos információ a vizsgált anyag szerkezeti képlete és kémiai tisztasága. Ugyancsak hasznos információ, hogy milyen kémiai folyamatokon megy keresztül a vizsgált anyag (például disszipáció, nem biológiai és biológiai lebomlás, stb.). A vizsgálat elvégzését megnehezítő fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkező anyagok vizsgálatára vonatkozóan a szakirodalom (12) nyújt további tájékoztatást.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

9. A vizsgálati protokoll és a vizsgálati körülmények megbízhatóságának megerősítése céljából rendszeres időközönként érdemes referencia-vegyianyagokkal elvégezni a vizsgálatot. Körvizsgálatokban és validálási vizsgálatokban eredményesen használt mérgező referenciaanyagok például a következők: lindane, trifluralin, pentaklórfenol, kadmium-klorid és a kálium-klorid (1)(2)(5)(6)(13).

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

10. A következő feltételeknek kell teljesülniük ahhoz, hogy a vizsgálat érvényes legyen:

— A lárvák kikelésének aránya a kontroll edényekben legalább 70 % a vizsgálat végén (1)(6).

— A kontroll edényekben 12–23 nappal a behelyezést követően kell megjelenniük a kifejlett *C. riparius* és *C. yoshimatsui* példányoknak; a *C. tentans* esetében ehhez 20–65 nap szükséges.

— A vizsgálat végén mindegyik edényben meg kell mérni a pH-t és az oldott oxigén koncentrációját. Az oxigénkoncentrációnak a levegő alkalmazott hőmérséklet melletti telítettségi értéke (ASV) legalább 60 %-ának kell lennie, a fedővíz pH-értékének pedig minden edényben a 6–9 tartományon belülre kell esnie.

▼M4

— a víz hőmérséklete legfeljebb ± 1,0 °C-kal változhat. A vízhőmérséklet szabályozásának egyik lehetséges módja, hogy a vizsgálatot állandó hőmérsékletű helyiségben végezzük, amely esetben a helyiség hőmérsékletét megfelelő időközönként ellenőrizni kell.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Vizsgálati edények

11. A vizsgálatot 600 ml-es üvegedényekben végezzük, amelyek átmérője 8 cm. Amennyiben az üledék és a fedővíz megfelelő mélysége biztosított, ettől eltérő edények is alkalmazhatók. Lárvánként 2–3 cm^2 nagyságú üledékfelületet kell biztosítani. Az üledékréteg és a fedővíz mélységének aránya 1:4 legyen. A vizsgálati edényeknek és a vizsgálati elrendezéssel érintkező egyéb készülékeknek teljes mértékben üvegből vagy más kémiailag semleges anyagból (például teflon) kell készülniük.

A fajok kiválasztása

12. A vizsgálatot lehetőleg a *Chironomus riparius* fajjal végezzük. *Chironomus tentans* is alkalmazható, de nehezebben kezelhető, és hosszabb vizsgálati időszakot igényel. *Chironomus yohimatsui* szintén használható. A 2. függelékben részletezett tenyésztési módszerek a *Chironomus riparius* fajra vonatkoznak. A szakirodalomban más fajok – úgymint a *Chironomus tentans* (4) és a *Chironomus yoshimatsui* (11) – tenyésztési körülményeire vonatkozó tudnivalók is megtalálhatók. A vizsgálat megkezdése előtt ellenőrzésképpen fajmeghatározást kell végezni, de ha a példányok saját tenyészetből származnak, akkor ezt nem szükséges minden vizsgálat előtt megtenni.

Üledék

13. Lehetőleg mesterséges üledék (más néven formulázott, kevert vagy műüledék) használata ajánlott. Ha azonban mégis természetes üledéket használunk, akkor azt jellemezni kell (legalább a pH-t és a szerves széntartalmat meg kell határozni, de más paraméterek, például a C/N arány és a szemcseszerkezet vizsgálata is ajánlott), és mentesnek kell lennie mindenféle szennyezéstől, valamint az árvaszúnyoggal versengő vagy az azt fogyasztó egyéb organizmusoktól. Az árvaszúnyoglárvákkal végzett toxicitási vizsgálatban való felhasználás előtt ajánlott továbbá a természetes üledéket az elkövetkező vizsgálat során uralkodókkal megegyező körülmények között hét napon keresztül kondicionálni. E vizsgálat során az alábbi, a C.8. vizsgálati módszerben (14) alkalmazott mesterséges talajon alapuló mesterséges üledék alkalmazása ajánlott (1)(15)(16):

a) 4–5 % (száraz tömeg) tőzeg, amelynek pH-ja a lehető legközelebb esik az 5,5–6,0 értékhez; fontos, hogy por alakú, finomra őrölt (részecskeméret ≤ 1 mm) és kizárólag levegőn szárított tőzeget használjunk.

b) 20 % (száraz tömeg) kaolinagyag (lehetőleg 30 % feletti kaolinit tartalommal).

c) 75–76 % (száraz tömeg) kvarchomok (túlnyomó részben finom homok, amely részecskéinek több mint 50 %-a 50 és 200 μm közötti szemcseméretttel rendelkezik).

d) Annyi ionmentesített víz, amely ahhoz szükséges, hogy végtermékként 30-50 % nedvességtartalmú keveréket kapjunk.

e) A végtermékként kapott üledékkeverék pH-jának 7,0 ± 0,5 értékre történő beállításához szükséges mennyiségű vegytiszta minőségű kalcium-karbonát ($CaCO_3$).

f) A végtermékként kapott keveréknek 2 % (±0,5 %) szerves széntartalommal kell rendelkeznie, amelyet az a) és c) pont szerinti megfelelő mennyiségű tőzeg és homok hozzáadásával érünk el.

▼M4

14. A tőzegnek, a kaolinagyagnak és a homoknak ismert forrásból kell származnia. Ellenőrizni kell, hogy az üledék összetevőiben nem fordulnak elő kémiai szennyeződések (például nehézfémek, szerves klórvegyületek, szerves foszforvegyületek, stb.) A mesterséges üledék elkészítésének egy példáját a 3. függelék mutatja be. Száraz összetevők keverése is elfogadott, amennyiben bizonyítható, hogy a fedővíz hozzáadását követően az üledék nem esik szét összetevőire (például a vízben lebegő tőzegrészecskékre), és a tőzeget vagy az üledéket megfelelően kondicionáltuk.

Víz

15. Az elfogadható hígítóvíz 2. és 4. függelékben felsorolt kémiai tulajdonságaival rendelkező bármely víz alkalmas a vizsgálathoz. Tenyésztővízként és kísérleti vízként bármely alkalmas víz, természetes víz (felszíni vagy talajvíz), mesterséges víz (lásd a 2. függeléket) vagy klórtalanított csapvíz elfogadható, amelyben az árvaszúnyoglárvák a tenyésztés és a vizsgálat időszaka alatt életben maradnak anélkül, hogy stressz jeleit mutatnák. A vizsgálat kezdetén a vizsgálathoz alkalmazott víz pH-értékének 6 és 9 között kell lennie, keménysége pedig nem haladhatja meg a 400 mg/l $CaCO_3$ értéket. Ennél lágyabb vizet kell azonban alkalmazni akkor, ha gyanítható, hogy a keménységet okozó ionok és a vizsgált anyag között kölcsönhatás alakul ki (és ezért ebben az esetben az Elendt-féle M4 közeg nem alkalmazható). A vizsgálat teljes időtartama alatt ugyanazt a víztípust kell használni. A 4. függelékben felsorolt vízminőségi jellemzőket évente legalább kétszer kell mérni, illetve minden olyan alkalommal, amikor fennáll a gyanúja annak, hogy e jellemzők jelentős mértékben megváltoztak.

Törzsoldatok – szennyezett víz

16. A vizsgálathoz használt koncentrációk kiszámítása a vízoszlopban, azaz az üledék feletti vízrétegben mérhető koncentrációk alapján történik. A vizsgálathoz használt, választott koncentrációjú oldatokat általában törzsoldat hígításával készítjük. A törzsoldatokat lehetőség szerint a vizsgált anyag vizsgálathoz használt közegben való feloldásával kell elkészíteni. Egyes esetekben oldószer vagy diszpergálószer használatára lehet szükség a megfelelő töménységű törzsoldat előállításához. Alkalmas oldószerek például a következők: aceton, etanol, metanol, etilénglikol-dimetiléter, dimetilformamid és trietilén-glikol. A felhasználható diszpergálószerek: Cremophor RH40, Tween 80, metilcellulóz (0,01 %-os) és HCO-40. Az oldódást segítő szer csak minimális (azaz $\leq$ 0,1 ml/l) koncentrációban lehet jelen a végtermékként kapott, vizsgálathoz használandó közegben, és minden kezeléshez ugyanazt a szert kell használni. Az oldódást segítő szer nem lehet jelentős hatással a túlélésre, és nem lehet látható hátrányos hatása az árvaszúnyoglárvákra a csak oldószerrel kezelt kontrollcsoporttal végzett vizsgálat által feltártak alapján.

A VIZSGÁLAT MEGTERVEZÉSE

17. A vizsgálat megtervezése a vizsgálat során alkalmazott koncentrációk számának és osztásközének, az egyes koncentrációkkal használt edények számának, valamint a lárvák edényenkénti számának a megválasztását jelenti. Ideális esetben a vizsgálatot az alábbiakra tekintettel kell megtervezni. Az EC pontnak és a NOEC becslésének, valamint a határérték-vizsgálatnak a megtervezését ismertetjük. A hipotézisvizsgálat elsődleges módszere a regressziós analízis.

A regressziós analízis megtervezése

18. A vizsgálat során alkalmazott koncentrációknak le kell fedniük a hatáskoncentrációt (például EC_{15}, EC_{50}) és azt a koncentrációtartományt, amelyen belül a vizsgált anyag érdeklődésre számot tartó hatással rendelkezik. A hatáskoncentráció becsléseknek (EC_x) a pontossága és különösképpen az érvényessége általában jobb, ha a hatáskoncentráció a vizsgált koncentrációtartományon belül helyezkedik el. A lehető legkisebb pozitív koncentrációnál jóval alacsonyabb és

▼M4

a legnagyobb koncentrációnál jóval magasabb értékek extrapolálását kerülni kell. Az alkalmazandó koncentrációtartomány kiválasztásához hasznos lehet előzetes behatároló vizsgálatot végezni (lásd 27. bekezdés).

19. Az EC_x becsléséhez legalább öt koncentrációt kell vizsgálni, és mindegyik koncentráció esetében három ismétlést kell alkalmazni. A jó modellbecslés lehetővé tétele érdekében minden esetben tanácsos elegendő vizsgálati koncentrációt használni. A rákövetkező koncentráció legfeljebb kétszerese legyen az előzőnek (kivételt képeznek azok az esetek, amikor a dózis-válasz görbe lapos). Az eltérő választ kiváltó vizsgálati koncentrációk számának emelkedése esetén az egyes kezeléseknél alkalmazott ismétlésszám csökkenthető. Az ismétlésszám növelése vagy a vizsgálat során alkalmazott koncentráció intervallum szűkítése általában a konfidencia intervallum csökkenéséhez vezet. A lárvák tíznapos túlélési arányának és fejlődési sebességének a becslése esetén további ismétlések szükségesek.

A NOEC/LOEC becslésének megtervezése

20. A LOEC/NOEC becsléséhez öt koncentrációt kell vizsgálni legalább négy ismétlést alkalmazva úgy, hogy a rákövetkező koncentráció legfeljebb kétszerese legyen az előzőnek. Az ismétlések számának elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy a kontrollhoz viszonyított 20 %-os különbséget 5 %-os szignifikancia-szint (p = 0,05) mellett megfelelő valószínűséggel kimutasson egy statisztikai próba. A fejlődési ütem esetében általában varianciaanalízist (ANOVA), például Dunnett vagy Williams próbát (17)(18)(19)(20) lehet alkalmazni. Ha a kikelési arányt vizsgáljuk, akkor a Cochran-Armitage, a Fisher-féle egzakt (Bonferroni-féle korrekcióval) vagy a Mantel-Haenszel próbát használhatjuk.

Határérték-vizsgálat

21. Határérték-vizsgálatot akkor lehet végezni (egy vizsgálati és egy kontroll koncentrációval), ha az előzetes behatároló vizsgálat során nem voltak megfigyelhető hatások. A határérték-vizsgálat célja annak jelzése, hogy a vizsgált anyagra vonatkozó toxikus érték nagyobb, mint a vizsgált koncentrációs határérték. Ennél a vizsgálati módszernél nem lehet meghatározni az ajánlott koncentrációt; ez a szabályozók megítélésétől függ. Általában mind a kezelés, mind a kontroll esetében legalább hat ismétlés szükséges. Bizonyítni kell, hogy a kontrollhoz viszonyított 20 %-os különbséget 5 %-os szignifikancia-szint (p = 0,05) mellett megfelelő valószínűséggel képes kimutatni egy statisztikai próba. Metrikus válasz (fejlődési ütem és súly) esetén alkalmas statisztikai módszer a t-próba, ha az adatok az alkalmazási feltételeknek (normalitás, szóráshomogenitás) megfelelnek. Ha a feltételek nem teljesülnek, akkor a nem egyenlő szórásnégyzeteket feltételező t-próba vagy egy nemparaméteres próba, például a Wilcoxon-Mann-Whithey próba alkalmazható.

ELJÁRÁS

Expozíciós körülmények

A szennyezett víz – üledék elrendezés előállítása

22. A vizsgálati edényekbe megfelelő mennyiségű mesterséges üledéket (lásd a 3. függelék 13–14. bekezdéseit) helyezünk úgy, hogy az üledékréteg legalább 1,5 cm legyen. 6 cm mélységig vizet adunk hozzá (lásd a 15. bekezdést). Az üledékréteg és a víz mélységének az aránya legfeljebb 1:4 lehet, és az üledékréteg mélysége nem haladhatja meg a 3 cm-t. A vizsgálathoz használt organizmusok behelyezése előtt hét napon keresztül finoman levegőztessük az üledék-víz elrendezés (lásd a 14. bekezdést és a 3. függeléket). Annak elkerülése érdekében, hogy a vizsgálathoz használt víz hozzáadása során az üledék összetevőire essen szét, és a finom anyag a vízrétegben felkavarodjon, az üledéket letakarhatjuk egy műanyag lappal, miközben a vizet ráöntjük, amelyet közvetlenül a felöntést követően eltávolítunk. Erre a célra más eszközök is alkalmasak lehetnek.

▼M4

23. A vizsgálati edényeket le kell fedni (például üveglappal). Az eredeti vízszint fenntartása érdekében a vizsgálat során pótoljuk az elpárolgott vizet, ha szükséges. A sófelhalmozódás elkerülése végett desztillált vagy ionmentesített vizet használjunk.

A vizsgálathoz használt organizmusok hozzáadása

24. A vizsgálathoz használt organizmusok vizsgálati edényekbe történő behelyezése előtt négy-öt nappal helyezzük a tenyészetből gyűjtött petecsomókat tenyésztőközeget tartalmazó kisméretű edényekbe. A törzstenyészetből vett vagy frissen készített tenyésztőközeg egyaránt használható. Ez utóbbi használata esetén adjunk a tenyésztőközeghez kis mennyiségű táplálékot, például zöldalgát és/vagy finomra őrölt pehely formájú haleledelből készített szuszpenzió szüredékéből néhány cseppet (lásd a 2. függeléket). Csak frissen lerakott petecsomókat szabad használni. A lárvák általában néhány nappal a peterakást követően kezdenek kikelni (a *Chironomus riparius* esetében ez 20 °C-on 2–3 nap, a *Chironomus tentans* és a *Chironomus yoshimatui* esetében pedig 23 °C-on, illetve 25 °C-on 1–4 nap). A lárvák fejlődése négy, egyenként 4–8 napig tartó szakaszra osztható. A vizsgálathoz az első fejlődési szakaszban lévő lárvákat kell gyűjteni (2–3 vagy 1–4 nappal a kikelést követően). Az árvaszúnyoglárvák fejlődési szakaszát a fejszélesség alapján ellenőrizhetjük (6).

25. Mindegyik szennyezett üledéket és vizet tartalmazó vizsgálati edénybe húsz darab, tetszőlegesen kiválasztott lárvát helyezünk egy tompa végű pipetta segítségével. A lárvák vizsgálati edénybe helyezésének ideje alatt állítsuk le a víz levegőztetését, és a behelyezést követő 24 órás időszakon keresztül hagyjuk így (lásd a 24. és a 32. bekezdést). Az alkalmazott vizsgálati tervnek (lásd a 19. és a 20. bekezdést) megfelelően az EC pont becsléséhez legalább 60, a NOEC meghatározásához 80 lárvát használjunk koncentrációnként.

26. Huszonnégy órával a lárvák behelyezését követően a vizsgált anyaggal szennyezzük a fedővíz-réteget, és ismét gyenge levegőztetést biztosítunk. Pipettával kis mennyiséget juttatunk a vízfelszín alá a vizsgált anyag oldatából. Ezt követően a fedővizet gondosan megkeverjük, ügyelve arra, hogy az üledék ne kavarodjon fel.

A vizsgálathoz használt koncentrációk

27. A vizsgálat végleges változatában használt koncentrációk meghatározásához hasznos lehet behatároló vizsgálatot végezni. E célra a vizsgált anyag koncentrációinak nagy osztásközű sorozatát használjuk. Annak érdekében, hogy az egy árvaszúnyoglárvára jutó felület megfeleljen a vizsgálat végleges változatában alkalmazandó lárvasűrűségnek, a lárvákat annyi ideig tesszük ki a vizsgált anyag egyes koncentrációinak, amely lehetővé teszi a megfelelő vizsgálati koncentrációk becslését anélkül, hogy ismétlésekre lenne szükség.

28. A vizsgálat végleges változatában használt koncentrációkat a behatároló vizsgálat eredménye alapján határozzuk meg. Legalább öt, a 18–20. bekezdésben leírt módszerrel kiválasztott koncentrációt kell használni.

Kontroll edények

29. A vizsgálat során a megfelelő ismétlésszám (lásd a 19–20. bekezdést) biztosításához szükséges számú – csak üledéket, a vizsgált anyagot viszont nem tartalmazó – kontroll edényt kell alkalmazni. Ha a vizsgált anyag bevitele oldószer segítségével történt (lásd a 16. bekezdést), akkor az oldószer hatásainak az ellenőrzése céljára külön kontroll edények szükségesek.

▼M4

Vizsgálati elrendezés

30. Statikus elrendezést alkalmazunk. Kivételes esetekben – például ha a vízminőségi jellemzők nem felelnek meg a vizsgálathoz használt organizmusoknak, vagy befolyásolják a kémiai egyensúlyt (például túlságosan lecsökken az oldott oxigénszint, túlságosan megnő a kiválasztási termékek koncentrációja, vagy ásványi anyagok lúgozódnak ki az üledékből és hatást gyakorolnak a víz pH-jára és/vagy keménységére) – félstatikus vagy átfolyó rendszerű, a fedővíz szakaszos vagy folyamatos cseréjét lehetővé tévő vizsgálati elrendezések is alkalmazható. Mindazonáltal a fedővíz minőségének javítására szolgáló módszerek, így például a levegőztetés, általában elégségesek, és előnyben részesítendők.

Táplálék

31. A lárvákat lehetőség szerint naponta vagy legalább hetente háromszor kell etetni. Az első 10 napban a fiatal lárvák számára megfelelőnek tűnik naponta lárvánként 0,25–0,5 mg (a *C. yoshimatui* esetében 0,35–0,5 mg) haleledelt adni (amely lehet vizes szuszpenzió vagy finomra őrölt eledel, például Tetra-Min vagy Tetra-Phyll; a részleteket lásd a 2. függelékben). Az idősebb lárváknak valamivel több táplálékra lehet szükségük: a vizsgálat hátralevő részében lárvánként naponta 0,5–1 mg mennyiségnek elegendőnek kell lennie. Gombaképződés vagy a lárvák pusztulása esetén a táplálékadagot valamennyi kísérleti és kontroll edényben csökkenteni kell. Ha a gombák szaporodása nem állítható meg, akkor a vizsgálatot meg kell ismételni. Erősen adszorbeálódó (például log K_{ow} > 5) vagy az üledékbe kovalens kötéssel beépülő anyagok vizsgálata esetén az organizmusok túlélésének és természetes fejlődésének biztosításához szükséges mennyiségű táplálékot még a stabilizálódás időszaka előtt a mesterséges üledékbe keverhetjük. Erre a célra haleledel helyett növényi anyagot használjunk (például 0,5 % finomra őrölt nagy csalán (*Urtica dioica*), fehér eperfa (*Morus alba*), fehér here (*Trifolium repens*), paraj (*Spinacia oleracea*) levelet vagy más növényi anyagot (*Cerophyl* vagy alfa-cellulóz) adhatunk az üledékhez).

Inkubációs körülmények

32. A lárvák vizsgálati edényekbe történő behelyezését követően lehetőleg 24 órán keresztül finoman levegőztessük a fedővizet, és a vizsgálat egész időtartama alatt biztosítsunk gyenge levegőztetést (ügyelve arra, hogy az oldott oxigén koncentrációja ne süllyedjen a levegő telítettségi érték (ASV) 60 %-a alá. A levegőt az üledékréteg fölött 2–3 cm-rel rögzített üveg Pasteur pipettán keresztül vezessük be (másodpercenként egy vagy néhány buborék). Illékony vegyi anyagok vizsgálata esetén megfontolandó, hogy az üledék-víz elrendezés levegőztetésétől eltekintsünk.

33. A vizsgálatot 20 °C (± 2 °C) állandó hőmérséklet mellett hajtsuk végre. *C. tentans* használata esetén 23 °C, a *C. yoshimatui* esetében pedig 25 °C az ajánlott hőmérséklet (± 2 °C). 16 órás fényperiódust alkalmazzunk, 500–1 000 lux fényintenzitással.

Expozíciós időtartam

34. A kitétel a lárvák szennyezett vizet tartalmazó, illetve kontroll edényekbe történő behelyezésekor veszi kezdetét. A maximális expozíciós időtartam a *C. riparius* és a *C. yoshimatsui* esetében 28 nap, *C. tentans* használata esetén 65 nap. Ha az árvaszúnyogok előbb kikelnek, akkor a vizsgálatot legalább öt nappal azt követően lehet befejezni, hogy a kontroll edényekben az utolsó kifejlett példány megjelent.

MEGFIGYELÉSEK

Kikelés

35. Meg kell határozni a fejlődési időt és a kikelt kifejlett hím és nőstény árvaszúnyogok összes számát. A hímek tollas csápjukról könnyen felismerhetők

▼M4

36. A kísérleti edényekben legalább hetente háromszor kell ellenőrizni a kontroll edényekben megfigyelhetőhöz képest rendellenesnek értékelhető viselkedést (például üledék elhagyása, szokatlan úszás). A kikelés várható időszaka alatt naponta meg kell számolni a kikelt árvaszúnyogokat. Naponta fel kell jegyezni a kikelt kifejlett egyedek nemét és számát. Az azonosítást követően az árvaszúnyogokat ki lehet engedni az edényekből. A vizsgálat befejezése előtt lerakott petecsomókat dokumentálni kell, és az új lárvák üledékbe kerülésének megelőzése érdekében el kell távolítani. Fel kell jegyezni továbbá a ki nem kelt bábok megfigyelhető számát. A kikelés méréséhez az 5. függelék nyújt útmutatást.

Fejlődés és túlélés

37. Ha a lárvák 10 napos túlélési és fejlődési adatait is be kell mutatni, akkor már a vizsgálat kezdetétől fogva a későbbiekben használható kiegészítő kontroll edényeket kell alkalmazni. Az ezekből származó üledéket átszitáljuk egy 250 μm-es szitán, amelyen a lárvák fennmaradnak. Az elhullás kritériumai a mozdulatlanság, illetve a mechanikai ingerekre adott válasz hiánya. A hiányzó lárvákat is elhullottnak kell tekinteni (a vizsgálat elején elpusztult lárvákat a mikroorganizmusok már lebonthatták). Meghatározzuk a túlélő lárvák edényenkénti (elhullott lárvák maradványai nélküli) száraz tömegét, majd kiszámítjuk az egyedek egy edényre eső átlagos száraz tömegét. A túlélő lárvák fejlődési szakaszának a meghatározása is hasznos; ezt a fejszélesség mérése segítségével tehetjük meg.

Analitikai mérések

A vizsgált anyag koncentrációja

38. A fedővíz, a pórusvíz és az üledék legnagyobb és legkisebb koncentrációnál vett mintáit legalább a vizsgálat kezdetén (lehetőleg egy órával a vizsgált anyaggal történő szennyezést követően) és végén analizálni kell. A vizsgált anyag így meghatározott koncentrációja tájékoztatást nyújt a vizsgált anyag viselkedéséről/megoszlásáról a víz-üledék elrendezésben. Mivel a vizsgálat kezdetén történő mintavétel az üledékből hatással lehet a vizsgálati elrendezésre (például a vizsgálathoz használt lárvák eltávolítása révén), külön kísérleti edényeket kell használni az analitikai meghatározások vizsgálat kezdetén és adott esetben a vizsgálat során (lásd a 39. bekezdést) történő elvégzéséhez. Az üledékre vonatkozó mérések nem feltétlenül szükségesek abban az esetben, ha a vizsgált anyag megoszlása a víz és az üledék között egyértelműen meghatározható egy – például az üledék vízhez viszonyított aránya, a szennyezés típusa, az üledék szerves széntartalma tekintetében – összehasonlítható körülmények között végzett víz/üledék vizsgálat segítségével.

39. Ha a vizsgálat közben is végzünk méréseket (például a 7. napon), és az analízishez nagy minták szükségesek, amelyek nem gyűjthetők a kísérleti edényekből anélkül, hogy a mintavétel a vizsgálati elrendezésre hatással lenne, az analitikai meghatározásokat ugyanolyan kezelésnek alávetett (a vizsgálathoz használt organizmusokat is beleértve), de a biológiai megfigyelések céljára nem használt, külön vizsgálati edényekből származó mintákon kell elvégezni

40. A pórusvíz elkülönítésére ajánlott módszer például a 10 000 g intenzitással történő centrifugálás 4 °C-on 30 percig. Szűrést is lehet alkalmazni, amennyiben bizonyított, hogy szűrő nem adszorbeálja a vizsgált anyagot. Ha a minta mérete túl kicsi, akkor előfordulhat, hogy nem analizálható a koncentráció a pórusvízben.

▼M4

Fizikai és kémiai paraméterek

41. A vizsgálathoz használt víz pH-ját és oldott oxigén koncentrációját, valamint a kísérleti edények hőmérsékletét megfelelő módon kell mérni (lásd a 10. bekezdést). A vizsgálat kezdetén és végén a legnagyobb koncentrációnál meg kell mérni a víz keménységét és ammónia tartalmát a kontroll edényekben és egy kísérleti edényben.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVVEZETÉS

Az eredmények kezelése

42. E vizsgálat célja a vizsgált anyag kikelt kifejlett hím és nőstény árvaszúnyogok összes számára és fejlődési ütemére, illetve 10 napos vizsgálat esetében a lárvák túlélésére és súlyára gyakorolt hatásainak a meghatározása. Ha semmi nem utal a nemek statisztikailag eltérő érzékenységére, akkor a hímekre és a nőstényekre vonatkozó eredmények a statisztikai elemzés céljára összevonhatók. Az érzékenység nemek közötti különbségének statisztikai megítélésére például a χ^2-r x 2 próba alkalmazható. Szükség esetén 10 nap elteltével meg kell határozni a lárvák túlélését és az egyedek egy edényre eső átlagos száraz tömegét.

43. A fedővízben mért koncentrációkként kifejezett hatáskoncentrációkat lehetőleg a vizsgálat kezdetén mért koncentrációk alapján kell kiszámítani (lásd a 38. bekezdést).

44. Az EC_{50} vagy bármely más EC_x pontbecsléséhez az edényenkénti statisztikákat valódi ismétléseknek kell tekinteni. Bármely EC_x konfidencia intervallumának a kiszámítása során vagy figyelembe kell venni az edények közötti eltéréseket, vagy ki kell mutatni, hogy az eltérés elhanyagolható mértékű. Ha a modell mérési pontokhoz illesztéséhez a legkisebb négyzetek módszerét használjuk, akkor a szóráshomogenitás javítása érdekében az edényenkénti statisztikákat transzformálni kell. Az EC_x értékeket az eredeti válaszértékekre való visszatranszformálás után kell kiszámítani.

45. Ha a statisztikai elemzés célja a NOEC/LOEC hipotézisvizsgálattal történő meghatározása, az edények közötti eltérések figyelembevételére például hierarchikus varianciaanalízist (nested ANOVA) kell végezni. Alternatívaként ennél robosztusabb próbák (21) is helyénvalók lehetnek olyan esetekben, amikor az ANOVA szokásos alapfeltevései nem teljesülnek.

Kikelési arány

46. A kikelési arányok kvantális adatok, amelyek a Cochran-Armitage próbával elemezhetők a lefelé lépegető eljárást alkalmazva, amennyiben arra számítunk, hogy a dózis-válasz függvény monoton, és az adatok ennek az elvárásnak megfelelnek. Ha ez nem így van, akkor a Fisher-féle egzakt próbát vagy a Mantel-Haenszel próbát használhatjuk a p-értékek Bonferroni- vagy Holm-féle eljárással történő korrekciójával. Ha az ugyanazon koncentrációhoz tartozó ismétlések közötti eltérések bizonyítottan nagyobbak, mint amit a binomiális eloszlás indokolna (amelyet gyakran „extra-binomiális” variációnak neveznek), akkor egy robusztus Cochran-Armitage vagy Fisher-féle egzakt próbát kell alkalmazni, mint amilyet például a (21) javasol.

47. Meg kell határozni az egy edényre jutó kikelt árvaszúnyogok számát (ne), majd el kell osztani a behelyezett lárvák számával (na):

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

ahol:

ER = kikelési arány

n_e = kikelt árvaszúnyogok egy edényre jutó száma

n_a = behelyezett lárvák egy edényre jutó száma

48. Egy másik, legfőképp nagy minták és extra-binomiális variáció esetén alkalmazható lehetőség, hogy a kikelési arányt folyamatos változóként kezeljük, és amennyiben arra számítunk, hogy a dózis-válasz függvény monoton, és ez az elvárás összhangban áll a kapott ER adatokkal, a Williams próbához hasonló eljárást alkalmazunk. Ha a monotonitás nem áll fenn, a Dunnett próbát lehet alkalmazni. A nagy mintát itt úgy értelmezzük, hogy az egy ismétlésre (edényre) jutó kikelt és nem kikelt árvaszúnyogok száma egyaránt meghaladja az ötöt.

49. Az ANOVA módszerek alkalmazásához az ER értékeket először négyzetgyök arkusz-szinusz vagy Freeman-Tukey transzformáció segítségével átalakítjuk, hogy a normálishoz közeli eloszlást kapjunk, és a szórásokat kiegyenlítsük. Abszolút gyakoriságok esetén a Cochran-Armitage, a Fisher-féle egzakt (Bonferroni) vagy a Mantel-Haenszel próbát használhatjuk. A négyzetgyök arkusz-szinusz transzformáció az ER négyzetgyökének az arkusz szinuszát ($\sin^{-1}$) adja.

50. A kikelési arányok meghatározásához regressziós analízissel (vagy például probit (22), logit, Weibull, kereskedelmi forgalomban kapható megfelelő szoftverrel) számítjuk ki az EC_x értékeket. Ha a regressziós analízis alkalmatlannak bizonyul (például kettőnél kevesebb részleges válasz esetén), más nemparaméteres módszert, például mozgóátlag-módszert vagy egyszerű interpolációt használunk.

Fejlődési ütem

51. Az átlagos fejlődési idő a lárvák kísérleti edényekbe történő behelyezésétől (a vizsgálat 0. napjától) az árvaszúnyogok kikeléséig tartó átlagos időtartamot jelenti. (A valódi fejlődési idő kiszámításához figyelembe kell venni a lárvák életkorát a behelyezés időpontjában). A fejlődési ütem a fejlődési idő reciproka (egysége: 1/nap), és a lárvafejlődés egy napra eső részét fejezi ki. Az ilyen jellegű üledék-toxicitási vizsgálatok értékeléséhez inkább a fejlődési ütemet használjuk, mivel kisebb a szórása, homogénebb és a normálishoz közelebb álló eloszlást mutat, mint a fejlődési idő. Ennélfogva a fejlődési ütem hatásosabb paraméteres vizsgálati eljárások alkalmazását teszi lehetővé, mint a fejlődési idő. A folyamatos változónak tekintett fejlődési ütemhez tartozó EC_x értékek becslésére regressziós analízist használunk (például (23)(24)).

52. A következő statisztikai próbákhoz feltételezzük, hogy az x. ellenőrzési napon megfigyelt számú árvaszúnyog az x. nap és az x–1. nap (l = az ellenőrzések közötti intervallum hossza, általában 1 nap) közötti időintervallum közepén kelt ki. Az egy edényre jutó átlagos fejlődési ütemet (x) a következő képlet szerint számítjuk ki:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

ahol:

$\bar{x}$: egy edényre jutó átlagos fejlődési ütem

i: ellenőrzési intervallum indexe

m: ellenőrzési intervallumok maximális száma

▼M4

f_i: az i ellenőrzési intervallumban kikelt árvaszúnyogok száma

n_e: kikelt árvaszúnyogok száma összesen a kísérlet végén (= $\sum f_i$)

x_i: az i ellenőrzési intervallumban kikelt árvaszúnyogok fejlődési üteme

$$x_i = 1 / \left(day_i - \frac{l_i}{2} \right)$$

ahol:

day_i: ellenőrzési nap (a behelyezés óta eltelt napok száma)

l_i: az i ellenőrzési intervallum hossza (napokban kifejezve, általában 1 nap)

Vizsgálati jegyzőkönyv

53. A vizsgálati jegyzőkönyvnek legalább a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

— fizikai jelleg és adott esetben a fizikai és kémiai tulajdonságok (vízoldékonyság, páranyomás, talajra (vagy ha rendelkezésre áll, az üledékre) vonatkozó megoszlási hányados, stabilitás vízben, stb.),

— kémiai azonosító adatok (közönséges név, kémiai név, szerkezeti képlet, CAS-szám, stb.,) beleértve a kémiai tisztaságot és a vizsgált anyag mennyiségi meghatározásának analitikai módszerét.

A vizsgálathoz felhasznált faj:

— a vizsgálathoz felhasznált állatok: faj, tudományos elnevezés, az organizmusok származása és tenyésztési körülményei,

— a petecsomók és a lárvák kezelésére vonatkozó információk,

— a vizsgálathoz felhasznált állatok életkora az edényekbe történő behelyezésükkor.

Vizsgálati körülmények:

— az alkalmazott üledék, azaz természetes vagy mesterséges üledék,

— természetes üledék esetén az üledékminta gyűjtésének helye és a mintavételi hely leírása, beleértve lehetőség szerint a szennyezés történetét; jellemzők: pH, szerves széntartalom, C/N arány és szemcseszerkezet (ha indokolt),

— a mesterséges üledék előállítása: összetevők és jellemzők (szerves széntartalom, pH, nedvességtartalom, stb. a vizsgálat kezdetén),

— a vizsgálathoz használt víz előállítása (mesterségesen készített víz esetén) és jellemzői (oxigénkoncentráció, pH, vezetőképesség, keménység, stb. a vizsgálat kezdetén),

— az üledék és a fedővíz mélysége,

— a fedővíz és a pórusvíz mennyisége; a nedves üledék tömege pórusvízzel és pórusvíz nélkül,

— vizsgálati edények (anyag és méret),

— a törzsoldatok előállításának módszere és a vizsgálathoz használt koncentrációk,

▼M4

— a vizsgált anyag bevitele: alkalmazott vizsgálati koncentrációk, ismétlésszám és esetlegesen használt oldószer,

— inkubációs körülmények: hőmérséklet, fényciklus és intenzitás, levegőztetés (gyakoriság és intenzitás),

— a táplálásra vonatkozó információk, beleértve a táplálék típusát, elkészítését, mennyiségét és a táplálás rendjét.

Eredmények:

— a névleges vizsgálati koncentrációk, a mért vizsgálati koncentrációk és a kísérleti edények vizsgált anyag koncentrációjának a meghatározására használt analízisek eredményei,

— a víz minősége a vizsgálati edényekben, azaz pH, hőmérséklet, oldott oxigén, vízkeménység és ammóniatartalom,

— az elpárolgott víz pótlása a vizsgálati edényekben, ha pótoljuk,

— a kikelt hím és nőstény árvaszúnyogok egy edényre és napra eső száma,

— ki nem kelt lárvák egy edényre jutó száma,

— a lárvák egy edényre és – adott esetben – egy fejlődési szakaszra jutó átlagos száraz tömege,

— ismétlésenkénti és vizsgálati koncentrációnkénti százalékos kikelés (hím és nőstény árvaszúnyogok együttesen),

— kikelt kifejlett árvaszúnyogok ismétlésenkénti és kezelési arányonkénti átlagos fejlődési üteme (hím és nőstény árvaszúnyogok együttesen),

— toxicitási végpontok – például EC_x (és a hozzá tartozó konfidencia intervallum), NOEC és/vagy LOEC – becsült értékei, valamint a meghatározásukhoz használt statisztikai módszerek,

— az eredmények szöveges elemzése, beleértve az e vizsgálati módszertől való eltérések vizsgálat kimenetelére gyakorolt hatását.

SZAKIRODALOM

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125–1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼M4

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Kultúra 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) E melléklet C.8. fejezete: Toxicitás földigilisztákra.

(15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

(16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096–1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482–491.

(19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103–117.

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510–531.

(21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577–585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485–1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼**M4**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

E módszer alkalmazásában a következő fogalommeghatározások alkalmazandók:

Mesterséges üledék vagy formulázott, kevert vagy műüledék: a természetes üledék fizikai összetevőinek az imitálására használt anyagok keveréke.

Fedővíz: a vizsgálati edényben az üledék felé kerülő víz.

Pórusvíz vagy szemcseközi víz: az üledék és a talaj szemcséi közötti helyet kitöltő víz.

Szennyezett víz: a vizsgált vegyi anyaggal szennyezett víz.

Vizsgált vegyi anyag: Bármely, ennek a vizsgálati módszernek az alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

▼M4

2. függelék

Ajánlások a *Chironomus riparius* tenyésztéséhez

1. Az árvaszúnyoglárvákat kristályosító csészékben vagy nagyobb edényekben tenyésztjük. Az edény aljára szórjunk vékony réteg (kb. 5–10 mm) kvarchomokot. A szilikagél (például Merck, cikkszám: 8117) is megfelelő szubsztrátumnak bizonyult (ebből vékonyabb, pár milliméternyi réteg is elegendő). Ezt követően töltsünk néhány centiméternyi megfelelő vizet az edénybe. A vízszint fenntartása és a kiszáradás megelőzése érdekében szükség szerint pótoljuk az elpárolgott vizet. Cserélhetjük is a vizet, ha kell. Biztosítsunk gyenge levegőztetést. A lárvatenyésztő edényeket tartsuk egy megfelelő ketrecben, amelyből a kikelő kifejlett példányok nem tudnak kiszökni. A ketrecben legyen elég hely a kikelt kifejlett példányoknak a mozgásra, mert ellenkező esetben nem fognak párosodni (minimum kb. 30 × 30 × 30 cm).

2. A ketreceket tartsuk szobahőmérsékleten vagy 20 ± 2 °C állandó hőmérsékletű helyiségben, 16 órán keresztül világosban (fényintenzitás kb. 1 000 lux) és 8 órán keresztül sötétben. Dokumentálták, hogy a 60 % RH alatti légnedvesség gátolhatja a szaporodást.

Hígítóvíz

3. Bármilyen alkalmas természetes vagy művíz használható. Általában kútvizet, klórtalanított csapvizet vagy mesterséges közeget (például Elendt-féle M4 vagy M7 közeget, lásd lentebb) használunk. Használat előtt a vizet levegőztetni kell. Szükség esetén cserélhetjük a tenyésztéshez használt vizet. Ehhez a használt vizet öntsük le vagy szívjuk ki a tenyésztő edényekből ügyelve arra, hogy a lárvák által épített lakócsöveket el ne pusztítsuk.

A lárvák táplálása

4. Az árvaszúnyoglárvákat pehely formájú haleledellel (Tetra Min®, Tetra Phyll® vagy hasonló, védett márkájú haltáppal) etessük, amelyből naponta körülbelül 250 mg-ot adjunk minden edényhez porrá őrölve szárazon vagy vizes szuszpenzióban, amelynek az elkészítéséhez 1,0 g pehely formájú haleledelt keverjünk el 20 ml hígítóvízben úgy, hogy homogén keveréket kapjunk. Ebből a készítményből naponta 5 ml-t adjunk minden edényhez (használat előtt felrázandó). Az idősebb lárvák kaphatnak ennél többet.

5. A táplálék mennyiségét a vízminőséghez kell igazítani. Ha a tenyésztőközeg zavarossá válik, akkor csökkenteni kell a mennyiséget. Az adott táplálék mennyiségét szigorú ellenőrzés alatt kell tartani. Ha túl kevés a táplálék, akkor a lárvák a vízrétegbe vándorolnak, ha túl sok, akkor fokozódik a mikrobatevékenység és csökken az oxigénkoncentráció. Mindkét körülmény a fejlődési ütem lassulását okozhatja.

6. Az újonnan létesített tenyésztő edényekhez zöldalga (például *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) sejtek is adhatók.

A kikelt kifejlett példányok táplálása

7. Egyes kísérletek szerint a kikelt kifejlett példányok számára egy telített cukoroldatba mártott vattakorong szolgálhat táplálékként.

▼M4

Kikelés

8. 20 ± 2 °C hőmérsékleten a kifejlett példányok körülbelül 13–15 nap elteltével kezdenek megjelenni a lárvatenyésztő edényekben. A hímek tollas csápjuk alapján könnyen megkülönböztethetők.

Petecsomók

9. Miután a kifejlett példányok megjelentek a tenyésztőketrecben, a lárvatenyésztő edényekben hetente háromszor ellenőrizni kell a lerakott zselatinszerű petecsomókat, amelyeket gondosan el kell távolítani, és át kell helyezni egy tenyésztővíz-mintát tartalmazó kisméretű edénybe. A petecsomókat új tenyészetek létrehozására (például 2–4 petecsomó/edény) vagy toxicitási vizsgálatok céljára használjuk fel.

10. Az első fejlődési szakaszban lévő lárváknak 2–3 napon belül kell kikelniük.

Új tenyészetek létesítése

11. A stabil tenyészetekből hetente vagy – a vizsgálati követelményektől függően – ritkábban friss lárvatenyészetek hozhatók létre, miközben a régebbi edényeket a kifejlett árvaszúnyogok megjelenését követően eltávolítjuk. Ezzel a rendszerrel minimális kezelést igénylő módon biztosítható a kifejlett példányok rendszeres utánpótlása.

A vizsgálathoz használt „M4” és „M7” oldatok előállítása

12. Az „M4” közeg leírása Elendt (1990) munkájában megtalálható. Az „M7” közeg ugyanúgy készül, mint az „M4”, azzal a különbséggel, hogy az 1. táblázatban feltüntetett anyagok koncentrációja az „M7” esetében négyszer alacsonyabb, mint az „M4” készítésekor. Az „M7” közegről szóló publikáció előkészületben van (Elendt, személyes közlés). A vizsgálathoz használt oldatot azért nem Elendt és Bias (1990) szerint kell előállítani, mert a törzsoldatok elkészítéséhez megadott NaSiO3 5 H_2O, NaNO3, KH2PO4 és K2HPO4 koncentrációk nem megfelelők.

Az „M7” közeg előállítása

13. Az (I) törzsoldatok mindegyikét külön kell elkészíteni, majd az (I) törzsoldatokból egy (II) kombinált törzsoldatot készítünk (lásd az 1. táblázatot). Az „M7” közeg előállításához a (II) kombinált törzsoldat 50 ml-ét és az egyes makrotápanyagok törzsoldatainak a 2. táblázatban megadott mennyiségeit ionmentesített vízzel 1 literre hígítjuk. Vitamin-törzsoldatot készítünk, amelyhez három vitamint ionmentesített vízhez adunk a 3. táblázatban meghatározottak szerint, majd röviddel a felhasználás előtt az „M7” közeghez adunk 0,1 ml-t a kombinált vitamin törzsoldatból. (A vitamin-törzsoldatot kis aliquot részekben, fagyasztott állapotban kell tartani). A közeget levegőztetni és stabilizálni kell.

1. táblázat

Nyomelemek törzsoldatai az M4 és M7 közeghez

(I) törzsoldatok	Ion-mentesített vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	A (II) kombinált törzsoldat előállításához az (I) törzsoldatok következő mennyiségeit (ml) elegyítjük és ionmentesített vízzel 1 literre hígítjuk		Végleges koncentráció a vizsgálathoz használt oldatban (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**

(I) törzsoldatok	Ion-mentesített vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	A (II) kombinált törzsoldat előállításához az (I) törzsoldatok következő mennyiségeit (ml) elegyítjük és ionmentesített vízzel 1 literre hígítjuk		Végleges koncentráció a vizsgálathoz használt oldatban (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Ezeknek az anyagoknak az esetében a fent jelzett módon eltér az M4 és az M7.
(2) Ezeket az oldatokat külön kell elkészíteni, majd összeönteni és azonnal autoklávban kezelni.

2. táblázat

Makrotápanyagok törzsoldatai az M4 és M7 közeghez

	Ion-mentesített vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	Makrotápanyagok törzsoldatainak M4 és M7 közeg előállításához használt mennyisége (ml/l)	Végleges koncentráció a vizsgálathoz használt M4 és M7 oldatban (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

3. táblázat

Vitamin-törzsoldatok az M4 és M7 közeghez

A három vitaminoldatból egyetlen kombinált vitamin-törzsoldatot készítünk.

	Ion-mentesített vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	Vitamin- törzsoldat M4 és M7 közeg előállításához használt mennyisége (ml/l)	Végleges koncentráció a vizsgálathoz használt M4 és M7 oldatban (mg/l)
Tiamin-hidroklorid	750	0,1	0,075
Cianokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

SZAKIRODALOM

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Kultúrad in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Kultúra Conditions on LIFE History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼M4

3. függelék

MESTERSÉGES ÜLEDÉK KÉSZÍTÉSE

Az üledék összetétele

A mesterséges üledék összetétele a következő:

Összetevő	Jellemzők	üledék száraz tömegének %-a
Tőzeg	Tőzegmoha, amelynek pH-ja a lehető legközelebb esik az 5,5-6,0 értékhez, és nem tartalmaz látható növénymaradványokat, finomra őrölve (részecskeméret ≤ 1 mm) és levegőn szárítva	4–5
Kvarchomok	Szemcseméret: a részecskék több mint 50 százaléka a 50–200 μm tartományban	75–76
Kaolinit agyag	Kaolinit tartalom ≥ 30 %	20
Szerves szén	Tőzeg és homok hozzáadásával beállítva	2 (±0,5)
Kalcium-karbonát	Porított, vegytiszta $CaCO_3$	0,05 - 0,1
Víz	Vezetőképesség ≤ 10 μS/cm	30 - 50

Elkészítés

A levegőn szárított tőzeget finom porrá őröljük. Nagyteljesítményű homogenizáló készülék segítségével ionmentesített vízzel szuszpenziót készítünk a szükséges mennyiségű tőzegporból. A szuszpenzió pH-ját $CaCO_3$ hozzáadásával beállítjuk 5,5 ± 0,5 értékre. A pH és a mikrobiológiai összetétel stabilizálása végett 20 ± 2 °C hőmérsékleten lassú keveréssel legalább két napig kondicionáljuk a szuszpenziót. Az ezt követően ismét megmért pH-nak 6,0 ± 0,5 értéket kell mutatnia. Ezek után a szuszpenziót összekeverjük a többi összetevővel (homok és kaolinagyag), valamint az ionmentesített vízzel úgy, hogy az üledék száraz tömegének 30–50 százaléka közötti víztartalommal rendelkező, homogén üledéket kapjunk. A végtermékként kapott keverék pH-ját ismételten megmérjük, és szükség esetén $CaCO_3$ hozzáadásával beállítjuk 6,5–7,5 értékre. Az üledékből vett minta alapján meghatározzuk a száraz tömeget és a szerves széntartalmat. Ezt követően az árvaszúnyogokkal végzett toxicitási vizsgálatban való felhasználás előtt ajánlott a mesterséges üledéket hét napig a vizsgálatban használni kívántakkal megegyező körülmények között kondicionálni.

Tárolás

A mesterséges üledék előállításához használt száraz összetevők száraz, hűvös helyen, szobahőmérsékleten tárolhatók. Az összeállított (nedves) üledék a vizsgálatban való felhasználás előtt nem tárolható. Az előállításának záró lépését képező 7 napos kondicionálási időszakot követően azonnal fel kell használni.

SZAKIRODALOM:

E melléklet C.8. fejezete: Toxicitás földigilisztákra.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10–20.

▼**M4**

4. függelék

Az elfogadható hígítóvíz kémiai tulajdonságai

Anyag	Koncentráció
Szemcsés anyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 mg/l
Ionizálatlan ammónia	< 1 μg/l
Keménység $CaCO_3$ koncentrációban kifejezve	< 400 mg/l (*)
Maradék klór	< 10 μg/l
Összes szerves foszfort tartalmazó növényvédő szer	< 50 ng/l
Összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer plusz poliklórozott bifenilek	< 50 ng/l
Összes szerves klór	< 25 ng/l

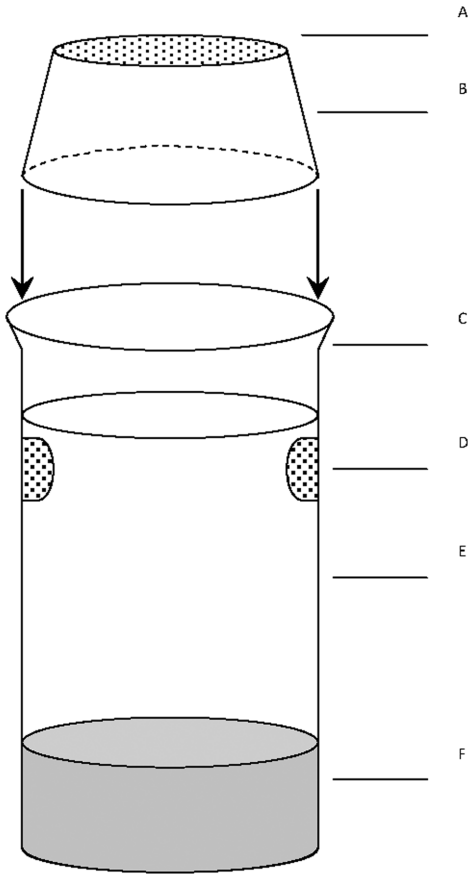
(*) Meg kell azonban jegyezni, hogy ha a keménységet okozó ionok és a vizsgált anyag között gyaníthatóan kölcsönhatás alakul ki, akkor lágyabb vizet kell alkalmazni (és ezért az Elendt-féle M4 közeg ilyen esetben nem alkalmazható).

▼**M4**

5. függelék

Útmutató az árvaszúnyoglárvák kikelésének figyelemmel kíséréséhez

A vizsgálati edényekre csapdákat helyezünk a kikelt példányok számára. A csapdák a 20. naptól a vizsgálat végéig szükségesek. Ezek egy példáját mutatja be az alábbi ábra:



A: nylon háló

B: fejjel lefelé fordított műanyagpohár

C: vizsgálati edény, kiöntő nélkül

D: hálós vízcserélő nyílás

E: víz

F: üledék

▼M4

C.29. GYORS BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG: SZÉN-DIOXID-VIZSGÁLAT LÉGMENTESEN ZÁRT EDÉNYEKBEN (A GŐZTÉR CO_2-TARTALMÁNAK VIZSGÁLATA)

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 310. vizsgálati iránymutatásában (2006) leírt módszerrel. A módszer olyan szűrővizsgálat, amely a vegyi anyagok gyors biológiai lebonthatóságának értékelésére szolgál, és hasonló információkat nyújt, mint az e melléklet C.4. fejezetében ismertetett A–F vizsgálati módszerek. Ezért azok a vegyi anyagok, amelyek esetében ez a vizsgálati módszer pozitív eredményt ad, biológiailag könnyen lebonthatónak, és ennek következtében a környezetben gyorsan lebomlónak tekinthetők.

2. A rosszul oldható és erősen adszorbeálódó vegyi anyagok esetében hagyományosan általában a jól bevált szén-dioxid-módszer (CO_2-módszer) (1) az elsődleges választás, amely a szerves vegyületek biológiai lebonthatóságának eredeti Sturm-féle vizsgálatán (2) alapul, és a mikrobatevékenység eredményeként felszabaduló szén-dioxid mérésével határozza meg a biológiai lebonthatóságot. Oldható (de nem illékony) vegyi anyagok esetében is erre a módszerre esik a választás, mivel sokan a szén-dioxid-fejlődést tekintik a mikrobatevékenység egyetlen kétségbevonhatatlan bizonyítékának. Az oldott szerves szén eltávolítása egyaránt lehet fizikai-kémiai folyamatok – adszorpció, volatilizáció, precipitáció, hidrolízis – és mikrobatevékenység eredménye, oxigénfogyasztás pedig számos nem biológiai reakcióban is megfigyelhető; CO_2 viszont ritkán keletkezik szerves vegyületekből nem biológiai úton. Az eredeti és a módosított Sturm-féle vizsgálatban (1)(2) a CO_2 eltávolítása a folyadékfázisból történik, és a CO_2 gáz-átbuborékoltatás eredményeként kerül az elnyelető edényekbe (a CO_2 eltávolítására megfelelő kezeléssel alkalmassá tett levegőt buborékoltatnak át a folyékony közegen), míg a Larson-féle változatban (3)(4) a CO_2 úgy kerül a reakcióedényből az abszorberekbe, hogy a vizsgálati edény folyamatos rázása mellett CO_2-mentes levegőt vezetnek keresztül a gőztéren. A reakcióedény rázása csak a Larson-féle módosításban szerepel; az ISO 9439 szabvány (5) és az Egyesült Államokban alkalmazott eredeti változat (6) csak oldhatatlan anyagok esetében ír elő keverést, és mindkettőben gáz-átbuborékoltatás, nem pedig a gőztér cseréje szerepel. Egy másik hivatalos, Gledhill módszerén (8) alapuló és az USA Környezetvédelmi Hivatala (EPA) által elfogadott módszer (7) szerint a CO_2-t a légkör felé zárt, rázott reakcióedényen belül közvetlenül a gázfázisból nyeletik el lúgban, miként a klasszikus Warburg–Barcroft-féle respirométer-palackban.

3. Kimutatták azonban, hogy a szabványos, módosított Sturm-féle vizsgálat számos vegyi anyag esetében történő alkalmazása során szervetlen szén (IC) halmozódik fel a közegben (9). 20 mg C/l koncentrációban használt anilin lebomlása során 8 mg/l IC koncentrációt is mértek. Ezért a lúgban elnyeletett CO_2 nem ad valódi képet arról, hogy a lebomlás során az egyes köztes időpontokban mennyi CO_2 keletkezik mikrobiológiai folyamatok eredményeként. Ennek következtében egyes vegyi anyagoknál, amelyek az oldott szerves szén (DOC) eltávolítása alapján biológiailag gyorsan lebonthatónak minősülnének, nem teljesül az a követelmény, amely szerint a biológiailag gyorsan lebontható anyagok esetében a CO_2-fejlődés elméleti maximumának ($ThCO_2$) több mint 60 %-át el kell érni a „tíznapos ablakban” (a 10 %-os biológiai lebomlás elérését közvetlenül követő 10 napban).

4. Ha a százalékos lebomlás értéke a vártnál alacsonyabb, akkor lehetséges, hogy IC halmozódott fel a vizsgálathoz használt oldatban. Ekkor a lebonthatóság a gyors biológiai lebonthatóság megállapítására szolgáló további vizsgálatokkal értékelhető.

▼M4

5. A Sturm-féle módszertan egyéb hátrányai (nehézkesség, időigényesség, nagyobb kísérleti hibalehetőség, és az illékony vegyi anyagok vizsgálatára való alkalmatlanság) arra ösztönözték a kutatókat, hogy a gázátáramoltatás (10)(11) helyett egy – a Gledhill által javasolttól eltérő – zárt edényes technikát keressenek. Boatman et al. (12) a korábbi módszerek áttekintését követően egy olyan zárt elrendezést alkalmazott, amelyben a közeg savas kezelését követően a CO_2 az inkubálás végén a gőztérbe távozik. A CO_2 mérésére a gőztérből automatikusan vett minták szervetlenszén-tartalmának gázkromatográfiás analízisét ((GC)/IC) használták, de a folyadékfázis oldott szervetlenszén-tartalmát (DIC) nem vették figyelembe. Emellett az alkalmazott edények nagyon kicsik (20 ml) voltak, és csak 10 ml közeget tartalmaztak, ami problémákat okozott: például az oldhatatlan vizsgált anyagokból szükségszerűen nagyon kis mennyiséget kellett bevinni, és/vagy előfordulhatott, hogy a beoltott közegben nem vagy nem kellő mennyiségben voltak jelen a vizsgált vegyi anyagok lebontására képes mikroorganizmusok.

6. E nehézségek leküzdéséhez Struijs és Stoltenkamp (13), valamint az anaerob körülmények közötti biológiai lebonthatóság vizsgálatában (15) használt készülékkel szerzett tapasztalataikból ihletet merítő Birch és Fletcher (14) független kutatásai járultak hozzá. Az előbbi szerzőpáros módszere (13) a gőztér CO_2-tartalmának savas kezelést és ekvilibrációt követő mérésén alapult, míg az utóbb említettek (14) mind a gázfázisban, mind a folyadékfázisban mérték a DIC értékét, és semmilyen kezelést nem alkalmaztak; a keletkező IC 90 %-a a folyadékfázisban volt jelen. A Sturm-féle vizsgálattal összehasonlítva mindkét módszer rendelkezik előnyökkel, mivel a vizsgálati elrendezés kompakt és jobban kezelhető, alkalmas az illékony vegyi anyagok vizsgálatára, és lehetővé teszi a felszabaduló CO_2 késleltetett mérésének az elkerülését.

7. Ezt a két megközelítést ötvözte a gőztér CO_2-tartalmának vizsgálatára vonatkozó ISO-szabvány (16), amelyet körvizsgálatnak is alávetettek (17), és amely az itt bemutatott vizsgálati módszernek is az alapját képezi. Ugyancsak ezt a két megközelítést használja fel az EPA módszere (18). A CO_2 mérésének két ajánlott módszere létezik: a gőztér CO_2-tartalmának meghatározása savas kezelést követően (13) és az IC meghatározása a folyadékfázisban lúgfölösleg hozzáadása után. Az utóbbi módszert Peterson vezette be annak a CONCAWE által végzett körvizsgálatnak (19) a során, amelynek tárgya a gőztér CO_2-tartalma vizsgálatának módosított, a jellegüknél fogva biológiailag lebontható anyagok értékelésére alkalmas módszere volt. Az itt bemutatott vizsgálati módszer tartalmazza a gyors biológiai lebonthatóság meghatározására vonatkozóan e melléklet C.4. fejezetében ismertetett módszereken az 1992-es átdolgozás (20) keretében végrehajtott módosításokat, így a vizsgálati körülmények (közeg, időtartam stb.) egyebekben megegyeznek a módosított Sturm-féle vizsgálatban alkalmazottakkal (20). Birch és Fletcher (14) kimutatták, hogy a gőztér CO_2-tartalmának e vizsgálata nagyon hasonló eredményeket adott, mint az átdolgozott vizsgálati módszerekre ugyanazon vegyi anyagokkal elvégzett OECD-körvizsgálat (21).

A VIZSGÁLAT ELVE

8. A kizárólagos szén- és energiaforrásként szolgáló vizsgált vegyi anyagot – általában 20 mg C/l koncentrációt alkalmazva – vegyes mikroorganizmus-populációval beoltott, ásványi sókat tartalmazó pufferközegben inkubáljuk. A vizsgálatot az aerob körülmények közötti teljes biológiai lebomláshoz szükséges oxigént tartalmazó gőztérrel rendelkező, légmentesen zárt palackokban végezzük. A vizsgált vegyi anyag aerob körülmények közötti teljes biológiai lebomlása során felszabaduló szén-dioxid meghatározásához megmérjük, hogy a kísérleti palackokban mennyivel több szervetlen szén (IC) keletkezik, mint a vakpróbákhoz használt, csak a beoltott közeget tartalmazó palackokban. A biológiai lebomlás mértékét az IC-termelődés elméleti maximuma (ThIC) százalékában fejezzük ki, a kezdetben bevitt vizsgált vegyi anyag (mint szerves szén) mennyisége alapján.

9. A DOC-csökkenés és/vagy a vizsgált vegyi anyag elsődleges biológiai lebonthatósága is mérhető (20).

▼M4

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

10. A százalékos lebomlás kiszámításához ismerni kell a vizsgált vegyi anyag szerves széntartalmát (tömegszázalékban kifejezve), amely a kémiai szerkezet alapján vagy méréssel határozható meg. Illékony vizsgált vegyi anyagok esetében a gőztér és a folyadék térfogata közötti megfelelő arány meghatározását segíti a mért vagy számított Henry-állandó. A vizsgált vegyi anyag mikroorganizmusokra gyakorolt toxikus hatására vonatkozó információk a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásához és a rossz biológiai lebonthatóságra utaló eredmények értelmezéséhez hasznosak: amennyiben nem bizonyított, hogy a vizsgált vegyi anyag nincs gátló hatással a mikrobatevékenységre, ajánlott a gátló hatás ellenőrzésére szolgáló kontrolledényt (lásd a 24. bekezdést) szerepeltetni a vizsgálatban.

A MÓDSZER ALKALMAZHATÓSÁGA

11. A vizsgálat a vízben oldható és a nem oldható vegyi anyagok vizsgálatára egyaránt alkalmas, bár a vizsgált vegyi anyag megfelelő eloszlatását biztosítani kell. Az ajánlott 1:2 gőztér-folyadék térfogatarány alkalmazása mellett az illékony vegyi anyagok 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ Henry-állandóig vizsgálhatók, mivel így a vizsgált vegyi anyag aránya a gőztérben nem fogja meghaladni az 1 %-ot (13). Illékonyabb vegyi anyagok vizsgálata esetén kisebb térfogatú gőztér is használható, de biológiai hasznosíthatóságuk korlátozó tényező lehet, különösen akkor, ha vízben rosszul oldódnak. A felhasználóknak úgy kell megválasztaniuk a gőztér és a folyadék térfogatának arányát és a vizsgált vegyi anyag koncentrációját, hogy elegendő oxigén álljon rendelkezésre az aerob körülmények közötti teljes biológiai lebomláshoz (azaz kerülni kell a magas szubsztrátumkoncentrációt és a kis gőztértérfogatot). Erre a kérdésre vonatkozóan a szakirodalom (13)(23) nyújt útmutatást.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

12. Az eljárás ellenőrzése érdekében érdemes egyidejűleg olyan referencia-vegyianyagokat is vizsgálni, amelyek biológiai lebonthatósága ismert. Vízben oldható vegyi anyagok vizsgálata esetén anilin, nátriumbenzoát vagy etilénglikol, rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok esetén pedig 1-oktanol használható erre a célra (13). E vegyületeknek a ThIC százalékában kifejezett biológiai lebomlásának 14 napon belül több mint 60 %-ot kell elérnie.

REPRODUKÁLHATÓSÁG

13. A módszer ISO-körvizsgálata (17) során a következő eredmények születtek az ajánlott körülmények között, a vizsgált vegyi anyag 20 mg C/l koncentrációban történő alkalmazása mellett.

Vizsgált vegyi anyag	Százalékos biológiai lebomlás középértéke (28 nap alatt)	Relatív szórás (%)	Laboratóriumok száma
Anilin	90	16	17
1-oktanol	85	12	14

A vizsgálaton belüli variabilitást (megismételhetőséget) illetően megállapítható, hogy anilin alkalmazása esetén szinte valamennyi vizsgálatsorozatban alacsony, 5 %-ot nem meghaladó volt a relatív szórás. A gyengébb megismételhetőséget mutató két esetben a nagyobb variabilitást valószínűleg az okozta, hogy a vakpróbákban magas volt az IC-termelődés. Az 1-oktanol alkalmazása gyengébb megismételhetőséget eredményezett, de a vizsgálatsorozatok 79 %-ában még így is 10 % alatt maradt a relatív szórás. Ebben az esetben adagolási hibák okozhatták a vizsgálaton belüli nagyobb variabilitást, mivel nagyon kis mennyiségű (3–4 μl) 1-oktanolt kellett befecskendezni a lezárt kísérleti palackokba. A vizsgált vegyi anyag kisebb koncentrációban történő alkalmazása nagyobb relatív szórást eredményezett, különösen a 10 mg C/l értéknél alacsonyabb koncentrációk esetében. Az oltóanyagban lévő összes szervetlen szén (TIC) koncentrációjának csökkentésével ez részben kiküszöbölhető volt.

▼M4

14. Egy EU-körvizsgálat (24) során, amelyben öt felületaktív anyagot alkalmaztak 10 mg C/l koncentrációban, a következő eredmények születtek:

Vizsgált vegyi anyag	Százalékos biológiai lebomlás középértéke (28 nap alatt)	Relatív szórás (%)	Laboratóriumok száma
Tetrapropilén-benzol-szulfonát	17	45	10
Diizooktil-szulfoszukcinát (anionos)	72	22	9
Hexadecil-trimetil- (*) ammónium-klorid (kationos)	75	13	10
Izononilfenol-(etoxilát)$_9$ (nem ionos)	41	32	10
Kókusz-amido-propil-dimetilhidroxi-szulfobetain (amfoter)	60	23	11

(*) A toxikus hatás semlegesítése SiO_2 hozzáadásával történt.

Az eredmények azt mutatják, hogy a nehezebben lebomló felületaktív anyagok esetében általában véve nagyobb volt a variabilitás. A vizsgálaton belüli variabilitás az esetek 90 %-ában nem érte el a 15 %-ot, a legmagasabb érték 30–40 % volt.

MEGJEGYZÉS: A felületaktív anyagok többségükben nem azonos szerkezetű molekulákból állnak, hanem több izomer, homológ stb. keverékei, amelyek lebomlása nem egyforma alkalmazkodási fázist követően, eltérő reakciósebesség mellett történik, „zavaros”, laposabb görbét eredményezve, ezért előfordulhat, hogy a „tíznapos ablakban” nem érhető el a 60 %-os megfelelési érték, holott az egyes molekulafajták önmagukban vizsgálva 10 nap alatt elérnék a 60 % feletti szintet. Ez a jelenség más összetett keverékek esetében is megfigyelhető.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

15. A szokásos laboratóriumi készülékek és:

a) üveg szérumpalackok, butilkaucsuk septummal rendelkező alumíniumkupakkal lezárva. Az ajánlott méret a 160 ml körüli össztérfogattal rendelkező „125 ml-es” palack (ebben az esetben mindegyik palacknak ismert, 160 ± 1 ml térfogatúnak kell lennie). Kisebb edény is használható, amennyiben az eredmények megfelelnek a 66. és a 67. bekezdésben leírt feltételeknek;

b) szénanalizátor vagy a szervetlen szén mérésére alkalmas egyéb műszer (pl. gázkromatográf);

▼M4

c) fecskendők nagy pontosságú gáz- és folyadékminta-vételhez;

d) orbitális rázókészülék szabályozott hőmérsékletű környezetben;

e) CO_2-mentes levegő-utánpótlás, amely levegő nátronmész-granulátumon történő átvezetésével vagy 80 % N_2/20 % O_2 összetételű gázkeverék alkalmazásával oldható meg (nem kötelező, lásd a 28. bekezdést);

f) membránszűrő berendezés 0,20–0,45 μm pórusmérettel (nem kötelező);

g) szervesszén-analizátor (nem kötelező).

Reagensek

16. Mindvégig analitikai tisztaságú reagenseket használjunk.

Víz

17. Olyan desztillált vagy ionmentesített vizet kell használni, amelynek összes szervesszén-koncentrációja ≤ 1 mg/l. Ez az ajánlott dózisban alkalmazott vizsgált vegyi anyaggal a vizsgálat kezdetén bevitt szerves széntartalom legfeljebb 5 %-ának felel meg.

Törzsoldatok az ásványisó-tartalmú közeg előállításához

18. A törzsoldatok és az ásványisó-tartalmú közeg hasonló az ISO 14593 szabvány (16) és a gyors biológiai lebonthatóság vizsgálata kapcsán a C.4. fejezetben leírt vizsgálati módszer (20) által előírthoz. Magasabb ammónium-klorid-koncentráció (0,5 g/l helyett 2,0 g/l) alkalmazása csak nagyon kivételes esetekben szükséges, például ha a vizsgált vegyi anyag koncentrációja > 40 mg C/l. A törzsoldatokat hűtve kell tárolni, és hat hónap után – kicsapódásra vagy mikroorganizmus-növekedésre utaló jel esetén korábban – meg kell semmisíteni. A következő törzsoldatokat kell elkészíteni:

a) 8,50 g kálium-dihidrogén-foszfátot (KH_2PO_4),

21,75 g dikálium-hidrogén-foszfátot (K_2HPO_4),

33,40 g dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrátot ($Na_2HPO_4.2H_2O$) és

0,50 g ammónium-kloridot (NH_4Cl)

vízben feloldunk, és 1 literre hígítunk. 7,4 (± 0,2) pH-jú oldatot kell kapnunk. Ha ez nem így van, akkor új oldatot kell készíteni.

b) 36,40 g kalcium-klorid-dihidrátot ($CaCl_2.2H_2O$)

vízben feloldunk, és 1 literre hígítunk.

c) 22,50 g magnézium-szulfát-heptahidrátot ($MgSO_4.7H_2O$)

vízben feloldunk, és 1 literre hígítunk.

d) 0,25 g vas(III)-klorid-hexahidrátot ($FeCl_3.6H_20$)

vízben feloldunk, és 1 literre hígítunk, és hozzáadunk egy csepp tömény HCl-t.

Ásványisó-tartalmú közeg előállítása

19. Az a) jelű oldatból 10 ml-t körülbelül 800 ml vízzel elkeverünk (17. bekezdés), majd hozzáadunk a b), a c) és a d) jelű oldatok mindegyikéből 1 ml-t, és az így kapott elegyet vízzel 1 literre hígítjuk (17. bekezdés).

Egyéb reagensek

20. Tömény foszforsav (H_3PO_4) (> 85 % m/V).

▼M4

Nátrium-hidroxid-oldat (7M)

21. Oldjunk fel 280 g nátrium-hidroxidot (NaOH) 1 liter vízben (17. bekezdés). Határozzuk meg az oldat DIC-koncentrációját, és ezt az értéket vegyük figyelembe a vizsgálat eredményének kiszámítása során (lásd az 55. és a 61. bekezdést), különös tekintettel a 66. bekezdés b) pontjában szereplő érvényességi kritériumra. Ha a DIC-koncentráció túl magas, készítsünk friss oldatot.

Vizsgált vegyi anyag

22. Ha a vizsgált vegyi anyag megfelelően oldható vízben, akkor készítsünk vízben (17. bekezdés) vagy a vizsgálathoz használt közegben (19. bekezdés) lehetőleg a vizsgálathoz használandó végleges koncentráció százszorosának megfelelő koncentrációjú törzsoldatot; ha a törzsoldat pH-ja nem megfelelő, akkor be kell állítani. A törzsoldatot adjuk az ásványisó-tartalmú közeghez úgy, hogy 2 és 40 mg C/l közötti, lehetőleg 20 mg C/l végleges szervesszén-koncentrációt kapjunk. Ennél alacsonyabb koncentráció esetén az eredmények pontossága romolhat. Az oldható és az oldhatatlan folyékony vizsgált anyagok nagy pontosságú fecskendő segítségével közvetlenül bejuttathatók az edényekbe. A rosszul oldható, illetve oldhatatlan vizsgált vegyi anyagok speciális kezelést igényelhetnek (25). A választási lehetőségek a következők:

a) ismert lemért mennyiségek közvetlen bejuttatása;

b) ultrahangos diszpergálás a hozzáadás előtt;

c) szétoszlatás emulgeálószer segítségével, amelynek mikrobatevékenységet gátló vagy serkentő hatását a hozzáadás előtt ellenőrizni kell;

d) a folyékony vizsgált vegyi anyag – vagy megfelelő, illékony oldószerrel készített oldata – adszorbeálása semleges közegen vagy eszközön (például üvegszálas szűrőn), majd az esetleg használt oldószer elpárologtatása, és ismert mennyiségek bejuttatása;

e) a vizsgált vegyi anyag könnyen párolgó oldószerrel készített oldata ismert mennyiségének bejuttatása az üres kísérleti edénybe, majd az oldószer elpárologtatása.

A c), a d) és az e) pontban említett szerek mikrobatevékenységet gátló vagy serkentő hatását a hozzáadás előtt vizsgálattal ellenőrizni kell (lásd a 42. bekezdés b) pontját).

Referencia-vegyianyag

23. Vízzel készítsünk a vizsgálathoz használandó végleges koncentráció (20 mg C/l) lehetőleg százszorosának megfelelő koncentrációjú törzsoldatot az (oldható) referencia-vegyianyagból (17. bekezdés).

Gátló hatás ellenőrzése

24. A gyors biológiai lebonthatóság értékeléséhez használt körülmények között a vizsgált vegyi anyagok gyakran nem mutatnak jelentős mértékű lebomlást. Ennek egyik lehetséges oka, hogy a vizsgált vegyi anyag a vizsgálat során alkalmazott koncentrációban gátló hatást gyakorol az oltóanyagra. A gátló hatás lehetséges okként vagy közreműködő tényezőként való (utólagos) azonosításának megkönnyítése érdekében a gátló hatás ellenőrzése beépíthető a vizsgálati tervbe. A másik lehetőség, hogy a gátló hatás ellenőrzése kizárja az ilyen zavaró kölcsönhatásokat, és kimutatja, hogy a lebomlás hiánya vagy csekély mértéke kizárólag annak tulajdonítható, hogy a vizsgált vegyi anyag a vizsgálati körülmények között nem hozzáférhető a mikrobák számára. A vizsgált vegyi anyag (aerob) mikroorganizmusokra gyakorolt toxikus hatására vonatkozó információk beszerzéséhez készítsünk a vizsgált vegyi anyagból és a referencia-vegyianyagból (19. bekezdés) oldatot a vizsgálathoz használt közegben úgy, hogy mindkettő az alkalmazott koncentrációban legyen jelen az oldatban (lásd a 22. és a 23. bekezdést).

▼M4

Oltóanyag

25. Az oltóanyag különféle forrásokból származhat: lehet eleveniszap, szennyvíztisztító elfolyó vize (klórozatlan), felszíni víz és talaj, vagy ezek keveréke (20). A forrás biológiai lebontó képességét referencia-vegyianyag segítségével ellenőrizzük. Bármely forrásból is származzanak, a vizsgált vegyi anyagnak korábban már kitett mikroorganizmusok nem alkalmazhatók, ha az eljárás célja a gyors biológiai lebonthatóság vizsgálata.

Figyelmeztetés: Az eleveniszap, a szennyvíz és a szennyvíztisztító elfolyó vize kórokozókat tartalmazhat, ezért körültekintéssel kell kezelni.

26. A tapasztalatok alapján az oltóanyag optimális mennyisége az a mennyiség, amely:

— elégséges biológiai lebontó képességet biztosít,

— a referencia-vegyianyag esetében a meghatározott százalékos lebomlást eredményezi (lásd a 66. bekezdést),

— milliliterenként 10^2–10^5 darab telepképző egységet biztosít a végtermékként kapott keverékben,

— szokásos körülmények között 4 mg/l lebegőanyag-koncentrációt biztosít a végtermékként kapott keverékben eleveniszap használata esetén; a koncentráció 30 mg/l értékig elfogadható, de ez jelentős mértékben növelheti a CO_2-fejlődést a vakpróbákban (26),

— a vizsgált vegyi anyaggal bevitt kezdeti szervesszén-koncentráció kevesebb mint 10 %-át adja,

— biztosítja, hogy a vizsgálathoz használt oldat 1 literére általában 1–10 ml oltóanyag jusson.

Eleveniszap

27. Az eleveniszapot frissen kell gyűjteni elsősorban háztartási szennyvizet fogadó szennyvíztisztító telep vagy laboratóriumi méretű szennyvíztisztító berendezés levegőztető tartályából. Szükség esetén a durva szemcséket szitálással el kell távolítani (például 1 mm^2 szemnagyságú szitaháló segítségével), és az iszapot a felhasználásig aerob körülmények között kell tartani.

28. A másik lehetőség a durva részecskék eltávolítása utáni ülepítés vagy centrifugálás (például 1 100 g intenzitással 10 percig). A felülúszó folyadékot távolítsuk el. Az iszapot át lehet mosni az ásványi oldattal. A tömény iszapot az ásványi oldatban szuszpendáljuk úgy, hogy 3–5 g/l lebegőanyag-koncentrációt kapjunk. Ezt követően az iszapot a szükséges időn keresztül levegőztessük.

29. Az iszapot megfelelően működő hagyományos szennyvíztisztító telepről kell gyűjteni. Ha az iszapot nagy terhelésű szennyvíztisztítóból kellett gyűjtenünk, vagy úgy gondoljuk, hogy gátló hatású anyagokat tartalmaz, akkor mosni kell. Az újraszuszpendált iszapot alapos keverést követően ülepítsük vagy centrifugáljuk, majd távolítsuk el a felülúszó folyadékot, és a mosott iszapot ismét szuszpendáljuk egy újabb adag ásványi közegben. Ezt az eljárást addig ismételjük, amíg az iszap a fölös szubsztrátumtól vagy gátló anyagoktól mentesnek tekinthető.

30. A teljes újraszuszpendálódás elérése után, vagy ha kezeletlen iszapot használunk, vegyünk mintát közvetlenül a felhasználás előtt a lebegőanyagok száraz tömegének meghatározása céljából.

31. Egy további lehetőség az eleveniszap homogenizálása (3–5 g/l lebegőanyag-koncentráció). Az iszapot Waring laboratóriumi turmixgépben közepes sebességgel 2 percig keverjük. Az így kezelt iszapot 30 percen vagy szükség esetén hosszabb időn keresztül hagyjuk ülepedni, majd az oltóanyagként használni kívánt folyadékot dekantáljuk úgy, hogy az ásványi közeg minden literére körülbelül 10 mg oltóanyag jusson.

▼M4

32. A vakpróbákban a CO_2-fejlődés még tovább csökkenthető az iszap egy éjszakán keresztüli, CO_2-mentes levegővel történő levegőztetésével. Ebben a vizsgálatban olyan oltóanyagot használjunk, amelynek eleveniszap-eredetű lebegőanyag-koncentrációja 4 mg/l (13).

Szennyvíztisztító tisztított elfolyó vize

33. Alternatívaként elsősorban háztartási szennyvizet fogadó szennyvíztisztító telep vagy laboratóriumi méretű szennyvíztisztító berendezés tisztított elfolyó vizéből is származhat az oltóanyag. A mintát aerob körülmények között kell tartani, és a gyűjtés napján fel kell használni, vagy szükség esetén előkondicionálni kell. A durva szemcsés anyag eltávolítása végett az elfolyó vizet durva szűrőn át kell szűrni, és meg kell mérni a pH-ját.

34. IC-tartalmának csökkentése érdekében 1 órán keresztül buborékoltassunk át a szüredéken CO_2-mentes levegőt (15. bekezdés e) pont), miközben a pH-t foszforsav segítségével tartsuk 6,5 értéken (20. bekezdés). Nátrium-hidroxiddal állítsuk vissza a pH eredeti értékét (21. bekezdés), és körülbelül 1 órás ülepítést követően vegyünk megfelelő mennyiségű felülúszó folyadékot oltóanyagnak. Az átbuborékoltatás csökkenti az oltóanyag IC-tartalmát. Például ha a szűrt és átbuborékoltatott elfolyó víz ajánlott maximális literenkénti mennyiségét (100 ml) használtuk oltóanyagként, a vakpróbákban az edényekben jelen lévő IC mennyisége a 0,4–1,3 mg/l tartományon belül volt (14), ami a vizsgált vegyi anyaggal bevitt szén 2–6,5 %-ának felel meg 20 mg C/l koncentráció alkalmazása esetén és 4–13 %-ának, ha az alkalmazott koncentráció 10 mg C/l.

Felszíni víz

35. Megfelelő felszíni vízből mintát veszünk. A mintát aerob körülmények között kell tartani, és a mintavétel napján fel kell használni. A mintát szükség esetén szűréssel vagy centrifugálással koncentráljuk. Az egyes kísérleti edényekben használandó oltóanyagnak meg kell felelnie a 26. bekezdésben meghatározott követelményeknek.

Talaj

36. Megfelelő talajból mintát veszünk a talajfelszín alatt legfeljebb 20 cm mélységből. A kövek, a növénymaradványok és a gerinctelen állatok eltávolítását követően a talajmintát 2 mm-es szitahálón átszitáljuk (ha a minta túl nedves az azonnali szitáláshoz, akkor a szitálás megkönnyítése érdekében levegőn kicsit szárítjuk). A mintát aerob körülmények között tartjuk, és a mintavétel napján felhasználjuk. (Ha a mintát lazán bekötött fekete polietilén tasakban szállítjuk, akkor abban 2–4 °C hőmérsékleten legfeljebb egy hónapig tárolható.)

Az oltóanyag előkondicionálása

37. Az oltóanyag előkondicionálható a kísérleti körülményekhez, de nem adaptálódhat előre a vizsgált vegyi anyaghoz a kísérlet megkezdése előtt. Előkondicionálással csökkenthető a vakpróbákban tapasztalható CO_2-fejlődés. Az előkondicionálás azt jelenti, hogy az eleveniszapot a vizsgálathoz használt közegben való, 30 mg/l koncentrációra történő feloldást követően CO_2-mentes nedves levegővel legfeljebb 5–7 napig levegőztetjük a vizsgálat során alkalmazandó hőmérsékleten.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

A palackok száma

38. A vizsgálathoz szükséges palackok száma (lásd a 15. bekezdés a) pontját) az analízisek gyakoriságától és a vizsgálat időtartamától függ.

39. Ajánlott a palackokat hármasával analízisnek alávetni olyan időintervallumonként, amely lehetőséget ad a „tíznapos ablak” meghatározására. Emellett a vizsgálat végén az a), a b) és a c) sorozatból (lásd a 42. bekezdést) legalább öt palackot (15. bekezdés a) pont) kell analizálni, hogy a százalékos biológiai lebomlás középértékének 95 %-os konfidenciaintervallumai kiszámíthatók legyenek.

▼M4

Beoltott közeg

40. Az oltóanyagot úgy kell használni, hogy 4 mg/l eleveniszap-eredetű szárazanyag-koncentrációt kapjunk. Közvetlenül a felhasználás előtt készítsünk elegendő mennyiségű beoltott közeget, például 2 ml megfelelően kezelt, 2 000 mg/l koncentrációjú eleveniszap (27–32. bekezdés) 1 liter ásványisó-közeghez való hozzáadásával (19. bekezdés). Szennyvíztisztító tisztított elfolyó vizének használata esetén legfeljebb 100 ml elfolyó vizet (33. bekezdés) kell 900 ml ásványisó-közeghez adni (19. bekezdés), és a közeggel 1 literre hígítani.

A palackok előkészítése

41. A beoltott közeg aliquot részeit adagoljuk a palackokba úgy, hogy a gőztér és a folyadék térfogataránya 1:2 legyen (például egy 160 ml befogadóképességű palackba 107 ml kerüljön). Ettől eltérő térfogatarány is alkalmazható, de a 11. bekezdésben foglaltakat figyelembe kell venni. Mindegyik oltóanyagtípus esetében ügyelni kell arra, hogy a beoltott közeg megfelelően legyen elkeverve, és így a kísérleti palackok között egyformán eloszlható legyen.

42. Az előkészített palacksorozatoknak (15. bekezdés a) pont) a következőket kell tartalmazniuk:

a) a kísérleti palackok (F_T) tartalmazzák a vizsgált anyagot;

b) a vakpróbákhoz használt kontrollpalackok (F_B) csak a vizsgálathoz használt közeget és az oltóanyagot tartalmazzák; ha a vizsgált anyag kísérleti edényekbe történő bejuttatásához bármilyen vegyi anyagot, oldószert, egyéb szert vagy üvegszálas szűrőt használtunk, akkor a palackoknak ezeket is tartalmazniuk kell;

c) az eljárás ellenőrzésére használt edények (F_C) referencia-vegyianyagot tartalmaznak;

d) amennyiben szükségesek, a vizsgált vegyi anyag lehetséges gátló hatásának ellenőrzésére használt edények (F_I) a vizsgált vegyi anyagot az F_T, a referencia-vegyianyagot az F_C palackokkal megegyező koncentrációban tartalmazzák (24. bekezdés);

e) a lehetséges nem biológiai lebomlási folyamatok ellenőrzésére használt edényekhez (F_S) az a) pontban leírtakon túl 50 mg/l $HgCl_2$-t kell adni vagy az edényeket más módon (például autoklávban) sterilizálni kell.

43. A vízben oldható vizsgált vegyi anyagok és referencia-vegyianyagok bejuttatása vizes törzsoldat formájában történik (22., 23. és 24. bekezdés) úgy, hogy 10–20 mg C/l koncentrációt kapjunk.

44. Az oldhatatlan vizsgált vegyi anyagok és referencia-vegyianyagok a vizsgált vegyi anyag természetének megfelelően különféle módszerekkel juttathatók a palackokba (lásd a 22. bekezdés a)–e) pontját) a beoltott közeg hozzáadása előtt vagy után, a vizsgált vegyi anyag kezelésének módszerétől függően. A 22. bekezdés a)–e) pontjában felsorolt eljárások alkalmazása esetén a vakpróbákhoz használt F_B palackokat (42. bekezdés b) pont) hasonló módon kell kezelni, de a vizsgált vegyi anyag vagy a referencia-vegyianyag nélkül.

45. Az illékony vizsgált vegyi anyagokat a lezárt palackokba kell befecskendezni (47. bekezdés) mikrofecskendő segítségével. A dózist a befecskendezett mennyiség és a vizsgált vegyi anyag sűrűsége alapján kell kiszámítani.

46. Az edényekbe szükség esetén vizet kell adagolni úgy, hogy mindegyik edényben egyforma legyen a folyadék mennyisége. A gőztér és a folyadék térfogatarányát (általában 1:2), valamint a vizsgált vegyi anyag koncentrációját úgy kell megválasztani, hogy a gőztérben elegendő oxigén álljon rendelkezésre a teljes biológiai lebomláshoz.

▼M4

47. Ezt követően valamennyi palackot le kell zárni, például butilkaucsuk septummal ellátott alumínium kupakkal. Az illékony vizsgált vegyi anyagokat ekkor kell bejuttatni (45. bekezdés). A vizsgálathoz használt oldat DOC-koncentrációja csökkenésének figyelése és a kezdeti IC-koncentráció vagy más meghatározandó tényezők nulladik időpontban végzett analízise esetén (steril kontrollok, 42. bekezdés e) pont), megfelelő mintát kell venni a kísérleti edényből. A kísérleti edényt és tartalmát ezt követően meg kell semmisíteni.

48. A lezárt palackokat (15. bekezdés d) pont) a tartalmuk alapos elkeverése és szuszpenzióban tartása céljára megfelelő rázási sebességet (pl. 150–200 rpm) biztosító rotációs rázókészülékre helyezzük (15. bekezdés d) pont), és sötétben, 20 °C ± 1 °C értéken tartott hőmérsékleten inkubáljuk.

Mintavétel

49. A mintavétel menete az alkalmazkodási fázis hosszától és a vizsgált vegyi anyag biológiai lebomlásának reakciósebességétől függ. Az analízis céljára felhasznált palackokat a legalább hetente vagy – a teljes bomlási görbe megrajzolásához – gyakrabban (például hetente kétszer) végzett mintavétel napján megsemmisítjük. Az F_T, az F_B és az F_C, valamint – ha használjuk – az F_I és az F_S palackokból (42. bekezdés) a szükséges számú darabot leveszszük a rázókészülékről. A vizsgálat időtartama általában 28 nap. Ha a biológiai bomlás görbéjéből arra lehet következtetni, hogy az állandósult állapot a 28. nap előtt beállt, akkor a 28. napnál korábban is be lehet fejezni a vizsgálatot. A százalékos biológiai lebomlás relatív szórását, illetve konfidenciahatárait a vizsgálat 28. napjára megmaradt öt palackból vett minták analízisének eredményeiből kell kiszámítani. A gátló hatás és a nem biológiai lebomlási folyamatok ellenőrzésére használt palackokból nem kell olyan gyakran mintát venni, mint a többi palackból: az 1. és a 28. napon végzett mintavétel elegendő.

Szervetlen szén (IC) analízise

50. A palackokban végbemenő CO_2-fejlődést a szervetlen szén (IC) koncentrációja inkubációs időszak alatti növekedésének mérésével határozzuk meg. A vizsgálat során keletkező IC-mennyiség mérésére két ajánlott módszer létezik, amelyeket az alábbiakban ismertetünk. Mivel a két módszer kissé eltérő eredményre vezethet, ugyanazon vizsgálatsorozaton belül csak az egyiket használjuk.

51. Az a) módszer alkalmazása akkor ajánlott, ha a közeg tartalmazhatja például az üvegszálas szűrőpapír és/vagy az oldhatatlan vizsgált vegyi anyag maradványait. Ha szénanalizátor nem áll rendelkezésre, akkor gázkromatográfot is használhatunk ennek az analízisnek az elvégzéséhez. Fontos, hogy a gőztér gáztartalmának elemzésekor a palackok hőmérséklete a vizsgálat során használt hőmérséklettel megegyező vagy ahhoz közeli legyen. Az IC mérésére szénanalizátort használó laboratóriumok a b) módszert egyszerűbbnek találhatják. Fontos, hogy a CO_2 karbonáttá alakításához használt nátrium-hidroxid-oldat (21. bekezdés) vagy frissen készüljön, vagy IC-tartalma ismert legyen, hogy a vizsgálat eredményeinek kiszámítása során ezt az értéket vehessük figyelembe (lásd a 66. bekezdés b) pontját).

a) módszer: 3 alatti pH-értéket eredményező savas kezelés

52. Az egyes analízissorozatok előtt az IC-analizátort megfelelő IC-etalonnal (pl. N_2 -ben 1 tömegszázalék CO_2) kalibrálni kell. A mintavételre felhasznált palackok mindegyikébe a septum kupakon keresztül tömény foszforsavat (20. bekezdés) fecskendezünk, hogy a pH-t 3 alatti értékre csökkentsük (például 107 ml vizsgálati közeghez 1 ml-t adunk). Ezt követően a palackokat visszahelyezzük a rázókészülékre. A vizsgálathoz használt hőmérsékleten egy óráig folytatott rázást követően a palackokat levesszük a rázókészülékről, és mindegyik palack gőzteréből aliquot résznyi (pl. 1 ml) mintát veszünk, amelyet az IC-analizátorba fecskendezünk. A mért IC-koncentrációt mg C/l mértékegységben jegyezzük fel.

▼M4

53. A módszer elve, hogy a 3 alatti pH-t eredményező savas kezelést és a 20 °C-on történő ekvilibrációt követően a folyadék- és a gázfázis közötti – koncentrációként mért – CO_2-megoszlás egyensúlyi állandója 1,0 (13). Ezt a következőképpen legalább egyszer ki kell mutatni a vizsgálati elrendezésre vonatkozóan:

Készítsünk 5 és 10 mg/l IC-koncentrációjú palackokat vízmentes nátrium-karbonát (Na_2CO_3) CO_2-mentes vízben készített oldatát alkalmazva, amelyhez tömény foszforsavval (20. bekezdés) savasítsuk úgy a vizet, hogy a pH 6,5 legyen, és egy éjszakán buborékoltassunk át rajta CO_2-mentes levegőt, majd lúggal emeljük a pH-t semleges szintre. Gondoskodjunk arról, hogy a gőztér és a folyadék térfogatának aránya ugyanolyan legyen, mint a vizsgálatok során (pl. 1:2). Az 52. bekezdésben leírtak szerint végezzük el a savas kezelést és az ekvilibrációt, majd mind a gőztérben, mind a folyadékfázisban mérjük meg az IC koncentrációját. Ellenőrizzük a két koncentráció kísérleti hibahatáron belüli egyezését. Ha az egyezés nem áll fenn, akkor ellenőrizni kell az eljárást. Az IC folyadék- és gázfázis közötti megoszlásának ezt az ellenőrzését nem kell minden vizsgálat alkalmával elvégezni, valószínűleg a kalibráció során a legcélszerűbb végrehajtani.

54. A DOC-csökkenés mérése esetén (csak vízben oldható vizsgált vegyületek esetében) a külön (savas kezelésnek nem alávetett) palackok folyadékfázisaiból vett mintákat membránszűrővel történő szűrést követően a DOC-analizátorba fecskendezzük. Ezek a palackok szükség szerint az elsődleges biológiai lebonthatóság mérésére szolgáló további analízisek céljára is felhasználhatók.

b) módszer: a CO_2 karbonáttá alakítása

55. Az egyes analízissorozatok előtt az IC-analizátort megfelelő etalonnal – például nátrium-bikarbonát ($NaHCO_3$) CO_2-mentes vízben készített, 0–20 mg/l tartományon belüli IC-koncentrációjú oldata (lásd az 53. bekezdést) felhasználásával – kalibrálni kell. A mintavételre felhasznált palackok mindegyikébe a septum kupakon keresztül nátrium-hidroxid-oldatot (7M, 21. bekezdés) fecskendezünk (például 107 ml közeghez 1 ml-t adunk), majd a palackokat a vizsgálathoz használt hőmérsékleten egy órán keresztül rázókészülékkel kezeljük. Az egy napon felhasznált palackok mindegyikéhez ugyanazt az NaOH oldatot használjuk, de ez nem szükséges a vizsgálat során végrehajtott valamennyi mintavétel esetében. Ha a mintavételek alkalmával az abszolút vak IC-értékeket is meg kell határozni, akkor az NaOH-oldat IC-koncentrációját minden egyes használat alkalmával meg kell határozni. A rázókészülékről való levételt követően hagyjuk ülepedni a palackok tartalmát. Mindegyik palack esetében fecskendővel szívjunk fel megfelelő mennyiséget (pl. 1 000-ből 50 µl) a folyadékfázisból. A mintákat fecskendezzük az IC-analizátorba, és jegyezzük fel az IC-koncentráció értékeit. E módszer használata során gondoskodni kell arról, hogy az alkalmazott analizátor képes legyen a lúgos minták kezelésére.

56. A módszer elve, hogy a lúgos oldat hozzáadását és a rázást követően elhanyagolható lesz az IC koncentrációja a gőztérben. Ezt IC-etalont használva legalább egyszer ellenőrizni kell a vizsgálati elrendezésre vonatkozóan, amelynek során a lúg hozzáadását és az ekvilibrációt követően mind a gőztérben, mind a folyadékfázisban meg kell mérni az IC koncentrációját (lásd az 53. bekezdést). A gőztérben nullához kell közelítenie a koncentrációnak. A lényegében teljes mértékű CO_2-abszorpciónak ezt az ellenőrzését nem szükséges minden vizsgálat alkalmával elvégezni.

57. A DOC-csökkenés mérése esetén (csak vízben oldható vizsgált vegyületek esetében) a külön (hozzáadott lúgot nem tartalmazó) palackok folyadékfázisaiból vett mintákat membránszűrővel történő szűrést követően a DOC-analizátorba fecskendezzük. Ezek a palackok szükség szerint az elsődleges biológiai lebonthatóság mérésére szolgáló további analízisek céljára is felhasználhatók

▼M4

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVVEZETÉS

Az eredmények kiszámítása

58. A vizsgált vegyi anyag 100 %-os mineralizációját, azaz teljes széntartalma CO_2-vé alakulását feltételezve a ThIC vakpróbákban keletkező mennyiséget meghaladó része az egyes kísérleti palackokba a vizsgálat kezdetén bejuttatott TOC mennyiséggel egyenlő, vagyis:

$$\text{ThIC} = \text{TOC}.$$

Az összes szervetlen szén (TIC) tömege (mg) az egyes palackokban:

$$\begin{aligned}\text{TIC} &= (\text{mg C a folyadékfázisban} + \text{mg C a gőztérben}) \\ &= (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H)\end{aligned} \qquad \text{[1] egyenlet}$$

ahol:

V_L = a folyadék térfogata a palackban (liter)

CL = IC koncentrációja a folyadékban (mg/l szénkoncentráció);

VH = a gőztér térfogata (liter);

CH = IC koncentrációja a gőztérben (mg/l szénkoncentráció).

A TIC kiszámítását az IC mérésére használható két analitikai módszerrel a 60. és a 61. bekezdés ismerteti. A százalékos biológiai lebomlás (*% D*) mindkét esetben:

$$\%\text{D} = \frac{(\text{TIC}_t - \text{TIC}_b)}{\text{TOC}} \times 100 \qquad \text{[2] egyenlet}$$

ahol:

TIC_t = a kísérleti palack TIC értéke a t időpontban (mg);

TIC_b = a vakpróbák TIC értékeinek középértéke a t időpontban (mg);

TOC = a kísérleti edénybe bejuttatott TOC kezdeti értéke (mg).

A százalékos biológiai lebomlást (% D) a kísérleti (F_T), a referencia-vegyianyagot tartalmazó (F_C) és – ha a vizsgálatban szerepelnek – a gátló hatás ellenőrzésére használt (F_I) palackokra egyaránt ki kell számítani az egyes mintavételi időpontokig keletkező TIC megfelelő mennyiségéből.

59. Ha a steril kontrollok (F_S) TIC-tartalma jelentős növekedést mutat a vizsgálat időszaka alatt, akkor ebből a vizsgált vegyi anyag nem biológiai úton történő lebomlására lehet következtetni, amit a D értékének [2] egyenlettel történő kiszámítása során figyelembe kell venni.

3 alatti pH-értéket eredményező savas kezelés

60. Mivel a 3 alatti pH-értéket eredményező savas kezelés kiegyenlíti a TIC koncentrációját a folyadék- és a gázfázisban, az IC-koncentrációt csak a gázfázisban kell mérni. Tehát az [1] egyenletből $\text{TIC} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, ahol V_B = a szérumpalack térfogata.

A CO_2 karbonáttá alakítása

61. Ennél a módszernél is az [1] egyenlettel végezzük a számításokat, de mivel az IC mennyisége a gázfázisban elhanyagolható, ezt nem vesszük figyelembe, vagyis $V_H \times C_H = 0$ és $\text{TIC} = V_L \times C_L$.

▼M4

Az eredmények kifejezése

62. A százalékos biológiai lebomlást (D) az inkubálási idő függvényében ábrázoló biológiai bomlási görbének lehetőség szerint mutatnia kell az alkalmazkodási fázist, a biológiai lebontási fázist, a tíznapos ablakot és az állandósult állapotot, azaz azt a fázist, amelyben a maximális lebomlási fok elérése után a görbe egy adott értéknél vízszintessé válik. Ha a párhuzamos kísérleti edények (F_T) értékei hasonlók (20 %-nál kisebb különbséget mutatnak), akkor elegendő a középértékek görbéjét megrajzolni (lásd 2. függelék, 1. ábra); ha nem, akkor minden egyes edény görbéjét meg kell rajzolni. Meg kell határozni a százalékos biológiai lebomlás állandósult állapothoz tartozó középértékét vagy a legmagasabb értékét (például amikor a görbe állandósult állapothoz tartozó szakasza csökkenést mutat), de az utóbbi esetben értékelni kell, hogy nem hibás értékről van-e szó. A vizsgálati jegyzőkönyvben a biológiai lebomlás így meghatározott maximális szintjét kell „a vizsgált vegyi anyag biológiai lebomlási fokaként" feltüntetni. Ha a kísérleti edények száma nem volt elegendő az állandósult állapot megjelenítéséhez, akkor a vizsgálat utolsó napján mért adatokat kell a középérték kiszámításához felhasználni. Ez az utolsó érték – öt ismétlés középértéke – jelzi a százalékos biológiai lebomlás meghatározásának pontosságát. A jegyzőkönyvben a „tíznapos ablak" végén kapott értéket is szerepeltetni kell.

63. Ugyanezzel a módszerrel meg kell rajzolni a referencia-vegyianyag (F_C) és – ha a vizsgálatban szerepelt – a nem biológiai lebomlási folyamatok és a gátló hatás ellenőrzésére használt edények (F_S és F_I) görbéjét.

64. Dokumentálni kell továbbá a vakpróbákhoz használt kontrollpalackokban (F_B) és – ha a vizsgálatban szerepeltek – a nem biológiai lebomlási folyamatok ellenőrzésére használt edényekben (F_S) jelen lévő TIC mennyiségét.

65. Számítsuk ki a keverék egyetlen összetevője, a referencia-vegyianyag alapján várható elméleti IC-hozam felhasználásával az F_I-vel jelölt edényekhez tartozó D értéket. Ha a 28. napon $[(D_{FC}\ (^1) - D_{FI}\ (^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, akkor feltételezhető, hogy a vizsgált vegyi anyag gátló hatással volt az oltóanyag aktivitására, és ez lehet a vizsgálati körülmények között kapott alacsony D_{FT} értékek magyarázata. Ebben az esetben a vizsgálatot alacsonyabb vizsgálati koncentrációval meg kell ismételni, és lehetőség szerint az oltóanyag DIC-tartalmát és a vakpróbákban keletkező TIC mennyiségét is csökkenteni kell, mert ellenkező esetben az alacsonyabb koncentráció alkalmazása csökkenteni fogja a módszer pontosságát. Alternatív megoldásként használhatunk másik oltóanyagot. Ha a nem biológiai lebomlási folyamatok ellenőrzésére használt F_S palackban a TIC mennyiségének jelentős (> 10 %) növekedése figyelhető meg, akkor lehetséges, hogy nem biológiai lebomlási folyamatok mentek végbe.

Az eredmények érvényessége

▼M7

66. A vizsgálat akkor tekinthető érvényesnek, ha:

a) a referencia-vegyianyagot tartalmazó F_C edényekben a százalékos lebomlás átlaga 60 % fölé emelkedik az inkubálás 14. napjáig; és

b) a vakpróbákhoz használt F_B edényekben jelen lévő TIC mennyiségének átlaga a vizsgálat végén nem éri el a 3 mg C/l értéket.

Ha ezek a határértékek nem teljesülnek, akkor a vizsgálatot egy másik forrásból származó oltóanyaggal meg kell ismételni, és/vagy felül kell vizsgálni az eljárásokat. Például ha az a probléma, hogy a vakpróbákban sok IC keletkezik, akkor a 27–32. pontban leírt eljárást kell alkalmazni.

(1) Százalékos lebomlás a referencia-vegyianyagot tartalmazó F_C edényekben.
(2) Százalékos lebomlás az F_I edényekben.

▼M4

67. Ha kimutatásra került, hogy a vizsgált vegyi anyagnak nincs gátló hatása (65. bekezdés), és mégsem sikerül elérni a ThIC 60 % százalékát, akkor a vizsgálatot emelt koncentrációjú oltóanyaggal (legfeljebb 30 mg/l eleveniszap, illetve literenként 100 ml szennyvíztisztító elfolyó vizének használata esetén) vagy más forrásokból származó oltóanyagokkal meg lehet ismételni, különösen akkor, ha a lebomlás a 20–60 % tartományon belül volt.

Az eredmények értelmezése

68. A ThIC 60 %-a feletti biológiai lebomlás a tíznapos ablakban ennél a vizsgálatnál azt mutatja, hogy a vizsgált vegyi anyag aerob körülmények között biológiailag gyorsan lebontható.

69. Ha a ThIC 60 %-aként meghatározott megfelelési értéket nem sikerül elérni, akkor meg kell határozni a közeg pH-értékét azokban a palackokban, amelyek nem lettek savval vagy lúggal kezelve; a 6,5 alatti érték arra utalhat, hogy nitrifikáció zajlott le. Ebben az esetben a vizsgálatot emelt koncentrációjú pufferoldattal meg kell ismételni.

Vizsgálati jegyzőkönyv

70. Állítsunk össze egy táblázatot, amely az egyes mintavételi napokon felhasznált minden egyes kísérleti palackhoz (F_T), referencia-vegyianyagot tartalmazó palackhoz (F_C) és – ha a vizsgálatban szerepel – gátló hatás ellenőrzésére szolgáló kontrollpalackhoz (F_I) tartozó % D értékeket mutatja. Dokumentáljuk a vakpróbákban (F_B) és a steril kontrollokban (F_S) keletkező TIC mennyiségét, a DOC értékeket és/vagy az egyéb meghatározandó értékeket, valamint ezek százalékos csökkenését.

71. Határozzuk meg az állandósult állapothoz tartozó % D értékek középértékét, vagy használjuk a legmagasabb értéket, ha a biológiai bomlási görbe állandósult állapothoz tartozó szakasza csökkenő, és a jegyzőkönyvben ezt tüntessük fel „a vizsgált vegyi anyag biológiai lebomlási fokaként”. Az utóbbi esetben ellenőrizni kell, hogy nem hibás értékről van-e szó.

72. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

— közönséges név, kémiai név, CAS-szám, szerkezeti képlet és a releváns fizikai és kémiai tulajdonságok,

— a vizsgált vegyi anyag kémiai tisztasága (szennyezettsége).

Vizsgálati körülmények:

— hivatkozás erre a vizsgálati módszerre,

— az alkalmazott vizsgálati elrendezés leírása (pl. az edény térfogata, a gőztér és a folyadék térfogatarányа, keverési módszer stb.),

— a vizsgált vegyi anyag és a referencia-vegyianyag vizsgálati elrendezésbe történő bevitele: alkalmazott vizsgálati koncentrációk és az egyes kísérleti palackokba adagolt szénmennyiség, oldószer esetleges használata,

— az alkalmazott oltóanyag részletezése, esetleges előkezelés és előkondicionálás,

— inkubálási hőmérséklet,

— az IC-analízis elvének validálása,

— az alkalmazott IC-analizátor (és bármely egyéb alkalmazott analitikai módszer) fő jellemzői,

— a párhuzamos edények száma.

Eredmények:

— nyers adatok és a biológiai lebonthatóság számított értékei táblázatos formában,

▼M4

— a vizsgált és a referencia-vegyianyagok százalékos lebomlását az idő függvényében ábrázoló grafikon, az alkalmazkodási fázis, a bomlási fázis, a tíznapos ablak és a meredekség,

— százalékos lebomlás az állandósult állapotban, a vizsgálat végén és a tíznapos ablak végén,

— a vizsgálati eredmények esetleges elvetésének oka,

— az alkalmazott eljárás szempontjából releváns bármely egyéb körülmény,

— az eredmények szöveges elemzése.

SZAKIRODALOM

(1) E melléklet C.4. fejezete: A „gyors” biológiai lebonthatóság meghatározása – CO_2-fejlődés-vizsgálat (C.4-C. módszer)

(2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159-167.

(3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.

(4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990; felülvizsgált szöveg: 1999). Vízminőség. Szerves vegyületek vizes közegben való teljes, aerob, biológiai lebonthatóságának kiértékelése. Szén-dioxid-fejlődéssel járó vizsgálat (Sturm).

(6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922-929.

(9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.

(10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181-185.

(11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.

(12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.

(13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.

(14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.

(15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593, (1999) Vízminőség. Szerves vegyületek teljes aerob biológiai lebonthatóságának kiértékelése vizes közegben. A lezárt edényzet szervetlen széntartalmának meghatározásán alapuló módszer (a gőztér CO_2-tartalmának vizsgálata).

(17) Battersby NS (1997). The ISO headspace C02 biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.

(18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An „inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

(20) E melléklet C.4. fejezete: A „gyors" biológiai lebonthatóság meghatározása

(21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.

(22) E melléklet C.11. fejezete: Eleveniszap-légzésgátlási vizsgálat.

(23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.

(24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

(25) ISO 10634 (1996) Vízminőség. Útmutató a vízben rosszul oldódó szerves vegyületek előkészítésére és kezelésére azok vizes közegben való biológiai lebonthatóságának értékeléséhez.

▼M4

1. függelék

RÖVIDÍTÉSEK ÉS FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

IC: Szervetlen szén

ThCO$_2$: Elméleti szén-dioxid-felszabadulás (mg): az a számított szén-dioxid-mennyiség, amelynek a vizsgált vegyi anyag ismert vagy mért széntartalmából létre kell jönnie a teljes mineralizáció során; mg fejlődött szén-dioxid/mg vizsgált vegyi anyag formában is használják.

DOC: Oldott szerves szén: az oldatban jelen lévő szerves szén, vagy a 0,45 mikrométeres szűrőn átszűrhető, vagy 15 percig tartó kb. 4 000 g (kb. 40 000 m sec^{-2}) intenzitású centrifugálást követően a felülúszó folyadékban maradó szerves szén.

DIC: Oldott szervetlen szén.

ThIC: Elméleti szervetlenszén-termelődés.

TIC: Összes szervetlen szén.

Biológiailag gyorsan lebontható: Önkényes besorolás, amelybe olyan vegyi anyagok tartoznak, amelyek bizonyos meghatározott, a teljes biológiai lebonthatóság meghatározására szolgáló szűrővizsgálatok követelményeinek megfeleltek; ezek a vizsgálatok olyan szigorúak, hogy feltételezhető, hogy az ilyen vegyi anyagok vízi környezetben aerob körülmények között biológiailag gyorsan és teljesen lebomlanak.

Tíznapos ablak: A 10 %-os biológiai lebomlás elérését közvetlenül követő 10 nap.

Jellegénél fogva biológiailag lebontható: Besorolás, amelybe olyan vegyi anyagok tartoznak, amelyekre nézve a biológiai lebonthatóság valamely vizsgálata egyértelműen igazolta az elsődleges vagy teljes biológiai lebonthatóságot.

Aerob körülmények közötti teljes biológiai lebomlás: Az a lebomlási szint, amely akkor következik be, amikor a vizsgált vegyületet teljesen felhasználják a mikroorganizmusok, és ez szén-dioxid, víz, ásványi sók és új mikrobás sejtalkotórészek (biomassza) keletkezését eredményezi.

Mineralizáció: A mineralizáció egy szerves vegyület teljes lebontása aerob körülmények között CO_2-re és H_2O-ra, anaerob körülmények között pedig CH_4-re, CO_2-re és H_2O-ra.

Alkalmazkodási fázis: A vizsgálat kezdetétől addig az időpontig tartó időszak, amikor a lebontó mikroorganizmusok akklimatizálódása és/vagy alkalmazkodása bekövetkezik, és a vizsgált vegyi anyag vagy szerves anyag biológiai lebomlása észlelhető szintet ér el (például a maximális elméleti biológiai lebomlás 10 %-át vagy ennél alacsonyabb szintet a mérési technika pontosságától függően).

Bomlási fázis: Az alkalmazkodási fázis végétől a maximális lebomlási szint 90 %-ának eléréséig tartó időszak

Állandósult állapot: Az állandósult állapot az a fázis, amelyben a lebomlás maximális szintet ér el, és a biológiai bomlási görbe vízszintessé válik.

Vizsgált vegyi anyag: Bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

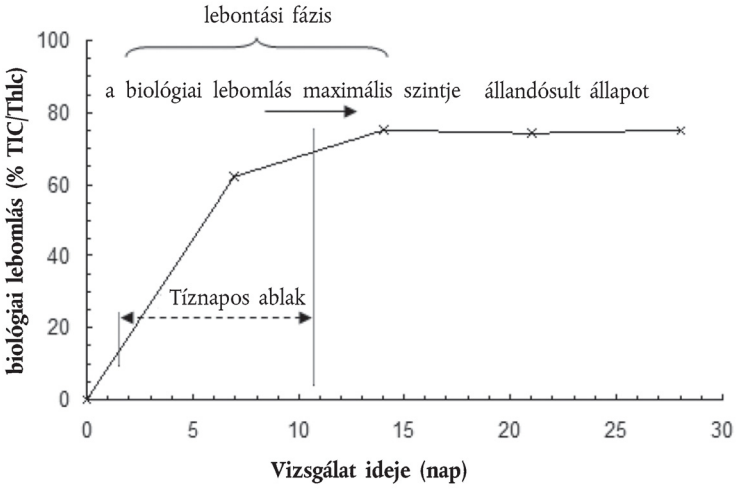
▼M4

2. függelék

Példa a biológiai bomlási görbére

1. ábra

1-oktanol biológiai lebomlása a gőztér CO_2 tartalmának vizsgálata során



Glosszárium

biológiai lebomlás

lebontási fázis

a biológiai lebomlás maximális szintje

állandósult állapot

Tíznapos ablak

Vizsgálat ideje (nap)

▼M4

C.30. BIOLÓGIAI FELHALMOZÓDÁS SZÁRAZFÖLDI KEVÉSSERTÉJŰEKBEN

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 317. vizsgálati iránymutatásában (2010) leírt módszerrel. A vegyi anyagok környezetben bekövetkező sorsára vonatkozó vizsgálati módszerek közül a „Biokoncentráció vizsgálata: átfolyásos hal vizsgálat" (e melléklet C.13. fejezete (49)) 1996-ban, a „Biológiai felhalmozódás fenékiszapban élő üledéklakó kevéssertéjűekben" (53) 2008-ban került kiadásra. A vegyi anyagok vízi környezetben élő szervezetekre vonatkozó biológiai felhalmozódására vonatkozó adatok azonban nehezen vagy egyáltalán nem extrapolálhatók szárazföldi szervezetekre, például földigilisztákra. A vegyi anyagok talajban való biológiai felhalmozódása értékelésére jelenleg a vizsgált vegyi anyag lipofilitásán alapuló modellszámításokat – például (14) (37) – használunk, például ahogy az EU szakmai útmutatója (19) leírja. A kompartment specifikus vizsgálati módszer iránti igény már megfogalmazódott a szakirodalomban (például (55)). Egy ilyen módszer különösen fontos a szárazföldi táplálékláncokban végbemenő másodlagos mérgezés értékeléséhez (4). A halaktól különböző szervezetekben való biológiai felhalmozódás vizsgálatára több nemzeti módszer létezik (például (2) és (72)). Az American Society for Testing and Materials kidolgozott egy módszert a szennyezett talajokból származó anyagok trágyagilisztákban (Eisenia fetida, Savigny) és televényférgekben való biológiai felhalmozódásának a mérésére (3). A biológiai felhalmozódás mesterségesen szennyezett talajban való meghatározásának egy nemzetközileg elfogadott módszere – például (25) (29) – javíthatja a vegyi anyagok szárazföldi ökoszisztémákra gyakorolt kockázatának az értékelését.

2. A talajban élő lebontó gerinctelen állatok ki vannak téve a talajhoz kötött vegyi anyagok hatásainak. Az ezen állatok közé tartozó szárazföldi kevéssertéjűek fontos szerepet játszanak a talaj szerkezete és funkciója szempontjából (15) (20). A szárazföldi kevéssertéjűek a talajban és részben a talajfelszínen (különösen az alomrétegben) élnek; a biomasszát tekintve gyakran a legnépesebb fajokat képviselik (54). A talajban végzett bioturbációs tevékenységük révén és zsákmányállatként ezek az állatok jelentős mértékben befolyásolhatják a vegyi anyagok más szervezetek, például gerinctelen állatok (például ragadozó atkák és bogarak; például (64)), illetve gerinces ragadozók (például róka, sirály) számára való biológiai hozzáférhetőségét (18) (62). A szárazföldi kevéssertéjűek közé tartozó egyes fajok ökotoxikológiai vizsgálatokban való jelenlegi felhasználását az 5. függelék ismerteti.

3. Az ASTM a földigilisztafélék családjába tartozó trágyagilisztával (Eisenia fetida) és a közönséges televényféreggel (Enchytraeus albidus) végzett laboratóriumi talajtoxicitási és bioakkumulációs vizsgálatokra vonatkozó irányadó útmutatója (3) számos alapvető és hasznos részletet közöl a talajból felvett vizsgált vegyi anyag biológiai felhalmozódása itt bemutatott vizsgálatának az elvégzésével kapcsolatban. A vizsgálati módszer ismertetése hivatkozik továbbá az OECD 315. vizsgálati iránymutatására (Biokoncentráció vizsgálata: átfolyásos hal vizsgálat) (49) és C.51. fejezetére (Biológiai felhalmozódás fenékiszapban élő üledéklakó kevéssertéjűekben) (53). A talajból felvett vizsgált vegyi anyag biológiai felhalmozódásának vizsgálatára vonatkozó gyakorlati tapasztalatok és szakirodalom – például (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79) – ugyancsak fontos információforrásként szolgálnak ehhez a vizsgálati módszerhez.

4. Ez a vizsgálati módszer leginkább a talajon való adszorbeálódásra hajlamos stabil, semleges szerves vegyi anyagok vizsgálatára alkalmas. Lehetővé teszi továbbá a talajrészecskékhez kötődő stabil fémorganikus vegyületek biológiai felhalmozódásának a vizsgálatát. Fémek és más nyomelemek esetében ugyancsak alkalmazható.

ELŐFELTÉTELEK

5. Vegyi anyagok szárazföldi kevéssertéjűekben való biológiai felhalmozódását eddig nehézfémek (lásd például (63)), valamint 3,0 és 6,0 közötti log K_{ow} értékekkel rendelkező megmaradó szerves vegyi anyagok – például (40) – esetében vizsgálták. Ilyen vizsgálatok vonatkoztak még a következőkre:

   — 6,0 feletti log K_{ow} értéket mutató vegyi anyagok (szuperhidrofób vegyi anyagok),

▼M4

— olyan vegyi anyagok, amelyek élő szervezetekben való biológiai felhalmozódásra való képessége ismert, például felületaktív vagy erősen adszorbeálódó vegyi anyagok,

— vegyi anyagok, amelyek szerkezeti jellemzői utalnak a biológiai felhalmozódás képességére, például ismert biológiai felhalmozódási potenciállal rendelkező vegyi anyagokkal analógok, és

— fémek.

6. A vizsgálat megkezdése előtt bizonyos információknak – mint amilyen például a közönséges név, a kémiai név (lehetőleg IUPAC név), a szerkezeti képlet, a CAS regisztrációs szám, a kémiai tisztaság, a biztonsági előírások, a megfelelő tárolási körülmények és az analitikai módszerek – rendelkezésre kell állniuk a vizsgált vegyi anyagokról. Mindezek mellett ismerni kell a következő információkat:

a) oldhatóság vízben;

b) oktanol-víz megoszlási hányados (K_{ow});

c) talaj- víz megoszlási hányados K_{oc}-ként kifejezve,

d) páranyomás;

e) lebomlási képesség (például talajban, vízben);

f) ismert metabolitok.

7. A vizsgált vegyi anyag lehet radioaktívan jelölt vagy nem jelölt. Az analízis megkönnyítése érdekében azonban ajánlott radioaktívan jelölt vizsgált vegyi anyagot használni. A döntést a kimutathatósági határértékek alapján kell meghozni, vagy attól függően, hogy a kiindulási vegyi anyagra és metabolitjaira vonatkozó mérések szükségesek-e. Radioaktívan jelölt vizsgált vegyi anyag használata és az összes radioaktív maradvány mérése esetén fontos jellemezni a kiindulási vegyi anyag és a kiindulási vegyi anyagtól eltérő jelölt anyag százalékarányát a talajban és a vizsgálathoz használt organizmusokban található radioaktívan jelölt maradványok esetében egyaránt, például az állandósult állapot időszaka alatt vagy a felvételi fázis végén gyűjtött mintákban, hogy a kiindulási vizsgált vegyi anyag és a talajban található metabolitok biológiai felhalmozódási tényezője (BAF) kiszámítható legyen (50. bekezdés). Az itt bemutatott módszer módosítható, például annak érdekében, hogy a radioaktívan nem jelölt szerves vizsgált vegyi anyagok vagy fémek méréséhez elegendő biomassza álljon rendelkezésre. Az összes radioaktív maradvány mérése esetén (az extrakciót, égetést vagy szövetstabilizálódást követő folyadékszcintillációs számlálással) a biológiai felhalmozódási tényezőt a kiindulási vegyi anyag és metabolitjai határozzák meg. A BAF kiszámítását lehetőség szerint az organizmusokban mért kiindulási vizsgált vegyi anyag és az összes radioaktív maradvány alapján kell végezni. Ezt követően a biológiai felhalmozódási tényezőből kiszámítható a féreg lipidtartalmára és a talaj szerves széntartalmára (OC) vonatkoztatott bióta-talaj felhalmozódási tényező (BSAF) a különböző biológiai felhalmozódási vizsgálatok eredményeinek az összehasonlítása végett.

8. Ismerni kell a vizsgált vegyi anyag vizsgálathoz használt fajokra gyakorolt toxikus hatását, például a felvételi fázis időtartamához tartozó hatáskoncentrációt (EC_x) vagy a letális koncentrációt (LC_x) (például (19)). A vizsgált vegyi anyag választott koncentrációja lehetőleg az akut aszimptotikus LC_{50} körülbelül 1 %-ának feleljen meg, és legalább tízszer nagyobb legyen, mint a használt analitikai módszerrel talajban kimutatható határérték. Lehetőség szerint a szubletális végpontokkal végzett hosszú távú vizsgálatokból származó toxicitási értékeket kell előnyben részesíteni (51) (52). Ha ilyen adatok nem állnak rendelkezésre, akkor egy akut toxicitási vizsgálat nyújthat hasznos információt (lásd például (23)).

▼M4

9. Rendelkezni kell egy ismert pontosságú, precizitású és érzékenységű, megfelelő analitikai módszerrel a vegyi anyag mennyiségi meghatározására a vizsgálathoz használt oldatokban, a talajban és a biológiai anyagban, a minták előállítására és tárolására vonatkozó részletes eljárásokkal, valamint az anyagbiztonsági adatlapokkal. Ismerni kell továbbá a vizsgált tétel talajban és féregszövetben való analitikai kimutathatóságának határértékeit. 14 C-vel jelölt vizsgált vegyi anyag használata esetén ismerni kell a fajlagos radioaktivitást (Bq/mol) és a szennyező anyagokhoz tartozó százalékos radioaktivitást. A vizsgált vegyi anyag fajlagos radioaktivitásának olyan nagynak kell lennie, hogy az analízist megkönnyítse, de a vizsgálathoz használt koncentráció ne váltson ki toxikus hatásokat.

10. A vizsgálat mesterséges talajjal és természetes talajokkal egyaránt végezhető. Természetes talaj használata esetén a vizsgálat megkezdése előtt ismerni kell például a talaj vagy a talajösszetevők eredetét, a pH-t, a szerves széntartalmat, a részecskeméret-eloszlást (homok, iszap és agyag százalékaránya) és a víztartó képességet (WHC) (3) (48).

A VIZSGÁLAT ELVE

11. A vizsgált vegyi anyag biológiai felhalmozódását jellemző paraméterek a biológiai felhalmozódási tényező (BAF), a felvételi sebességi állandó (k_s) és az ürülési sebességi állandó (k_e). Meghatározásaikat az 1. függelék tartalmazza.

12. A vizsgálat két fázisra oszlik: a felvételi (expozíciós) fázisra és az ürülési (expozíció utáni) fázisra. A felvételi fázisban kellő ismétlésszámot alkalmazva férgek csoportjait tesszük ki a vizsgált vegyi anyaggal mesterségesen szennyezett talaj hatásának. A kísérleti állatok mellett a vizsgált vegyi anyagtól eltekintve ugyanolyan körülmények között tartott kontrollcsoportokat alkalmazunk. Mérjük a kísérleti organizmusok száraz tömegét és lipidtartalmát. A kontrollcsoportba tartozó férgek esetében is meg lehet tenni ugyanezt. Analitikai háttérértékek (vakértékek) a kontrollcsoportba tartozó férgekből és a talajból vett minták elemzésével kaphatók. Az ürülési fázishoz a férgeket át kell helyezni a vizsgált vegyi anyagot nem tartalmazó talajba. Az ürülési fázis csak akkor hagyható el, ha az expozíciós fázisban jelentős mértékű volt a vizsgált vegyi anyag felvétele. Az ürülési fázis arról nyújt tájékoztatást, hogy a kísérletben részt vevő szervezetek milyen ütemben választják ki a vizsgált vegyi anyagot (például (27)). Ha a felvételi fázis során nem állt be állandósult állapot, akkor a kinetikai paramétereket – a kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőt (BAF_k), valamint a felvételi és az ürülési sebességi állandó(ka)t – a felvételi és az ürülési fázisokban kapott eredmények szimultán illesztése alapján kell meghatározni. A vizsgált vegyi anyag koncentrációját a férgekben/férgeken a vizsgálat mindkét fázisa során mindvégig figyelemmel kell kísérni.

13. A felvételi fázisban az állandósult állapot eléréséig legfeljebb 14 napig (televényférgeknél) vagy 21 napig (földigilisztáknál) kell mintákat venni a mérések elvégzéséhez (11) (12) (67). Az állandósult állapot akkor következik be, amikor a férgekben mért koncentrációt az idő függvényében mutató görbe az időtengellyel párhuzamossá válik, és a legalább kétnaponta vett mintákon végzett koncentrációanalízisek statisztikai összehasonlítása (például varianciaanalízis, regressziós analízis) három egymást követő esetben legfeljebb ± 20 %-os eltérést mutat.

14. Az ürülési fázishoz a vizsgálathoz használt organizmusokat át kell helyezni olyan edényekbe, amelyek ugyanazt a szubsztrátumot tartalmazzák, de a vizsgált vegyi anyag nélkül. Az ürülési fázis során 14 napon keresztül (televényférgeknél) vagy 21 napon keresztül (földigilisztáknál) kell mintákat venni a mérések elvégzéséhez, kivéve, ha a korábbi analitikai meghatározások a vizsgált vegyi anyag 90 %-os csökkenését mutatták a férgekben. A vizsgált vegyi anyagnak az ürülési fázis végén a férgekben mért koncentrációját ki nem választott maradványokként kell dokumentálni. Lehetőleg

▼M4

egyaránt ki kell számítani az állandósult állapothoz tartozó biológiai felhalmozódási tényezőt (BAFss) – a láthatóan beállt állandósult állapotban a férgekben (Ca) és a talajban (Cs) mért koncentrációk hányadosaként – és a kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőt (BAFK) – a talajból való felvétel sebességi állandója (ks) és az ürülési sebességi állandó (ke) hányadosaként (a meghatározásokat lásd az 1. függelékben), elsőrendű kinetikát feltételezve (a számításokat lásd a 2. függelékben). Ha nyilvánvalóan nem elsőrendű a kinetika, akkor más modelleket kell alkalmazni.

15. A felvételi sebességi állandót, az ürülési sebességi állandót (vagy más modellek használata esetén állandókat), a kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőt (BAF_K) és – amennyiben lehetséges – e paraméterek mindegyike esetében a konfidenciahatárokat számítógépes módszerrel kell kiszámítani modellegyenletekből (az útmutatást lásd a 2. függelékben). Bármely modell esetében az illeszkedés megfelelősége meghatározható például a korrelációs együttható vagy a determinációs együttható alapján (az együttható 1-hez közeli értéke jelzi a jó illeszkedést), vagy khi-négyzet próbával. A becsült paraméterek szórásából vagy konfidenciahatárából is következtetni lehet a modell illeszkedésének megfelelőségére.

16. Erősen lipofil vizsgált anyagok esetén a vizsgálati eredmények variabilitásának csökkentése érdekében a biológiai felhalmozódási tényezőket a lipidtartalomra és a szerves széntartalomra vonatkoztatva kell kifejezni (a talaj szerves széntartalmának (OC) hány kilogrammja jut a férgek lipidtartalmának egy kilogrammjára). Ez a megközelítés azon a tényen alapul, hogy a vegyi anyagok egyes osztályainál nyilvánvaló összefüggés áll fenn a biológiai felhalmozódási potenciál és a lipofilitás között, amint azt halaknál egyértelműen kimutatták (47). Az ilyen vegyi anyagok biológiai felhalmozódása a hal lipidtartalmától függ. A fenékiszapban élő organizmusoknál is hasonló korrelációt állapítottak meg, például (30) (44). A szárazföldi kevéssertéjűeknél is kimutattak hasonló összefüggést, például (5) (6) (7) (14). Ha elegendő féregszövet áll rendelkezésre, akkor a kísérleti állatok lipidtartalmát ugyanabból a biológiai anyagból lehet meghatározni, mint amit a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának a meghatározására használunk. A másik lehetőség, hogy kontroll állatokat használunk a lipidtartalom mérésére.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

17. A következő feltételeknek kell teljesülniük mind a kontrollok, mind a kezelések során ahhoz, hogy a vizsgálat érvényes legyen:

— A vizsgálat végén a felvételi és az ürülési fázisban mért mortalitás összességében nem haladhatja meg a behelyezett férgek összlétszámának 10 %-át (földigilisztáknál), illetve 20 %-át (televényférgeknél).

— *Eisenia fetida* és *Eisenia andrei* használata esetén a felvételi és az ürülési fázis végén mért tömegveszteség középértéke nem haladhatja meg az egyes fázisok elején mért kezdeti friss tömeg 20 %-át.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

A vizsgálathoz használt fajok

18. A biológiai felhalmozódás vizsgálatához a szárazföldi kevéssertéjűek közé tartozó több faj is ajánlott. A leggyakrabban használt fajok az Eisenia fetida vagy Eisenia andrei (földigiliszta-félék), illetve az Enchytraeus albidus, Enchytraeus crypticus vagy Enchytraeus luxuriosus (televényférgek), amelyek leírását az 5. függelék tartalmazza.

▼M4

Készülékek

19. A berendezés valamennyi részét illetően kerülni kell az olyan anyagok használatát, amelyek oldódhatnak, adszorbeálhatják a vizsgált vegyi anyagot, vagy amelyekből más vegyi anyagok mosódhatnak ki, illetve amelyek ártalmasak lehetnek a vizsgálathoz használt állatokra. Szabványos, kémiailag semleges anyagból készült, a terhelés mértékének – vagyis a kísérleti állatok számának – megfelelő térfogatú négyszögletes vagy hengeres edények használhatók. A vizsgálathoz használt közeggel érintkező felszerelések rozsdamentes acélból, műanyagból vagy üvegből készülhetnek. A vizsgálati edényeket megfelelő módon le kell fedni, hogy a férgek ne szökhessenek ki belőlük, de az elegendő levegőellátás biztosított legyen. Magas adszorpciós együtthatóval rendelkező vegyi anyagok, például szintetikus piretroidok vizsgálata esetén szilanizált üveg használata lehet szükséges. Ilyenkor a felszerelést használat után meg kell semmisíteni (49). Ügyelni kell, hogy a radioaktívan jelölt vizsgált tételek és illékony vegyi anyagok ne kikerülhessenek ki a vizsgálati elrendezésből. Megfelelő abszorbenst tartalmazó csapdák (például üveg gázmosó palackok) alkalmazásával meg kell akadályozni a maradványok elillanását a vizsgálati edényekből.

Talaj

20. A vizsgálathoz olyan minőségű talajt kell használni, amely lehetővé teszi a vizsgálathoz használt organizmusok túlélését és lehetőség szerinti szaporodását az alkalmazkodási és a vizsgálati időszakok alatt anélkül, hogy rendellenes megjelenést vagy viselkedést mutatnának. A férgeknek bele kell ásniuk magukat a talajba.

21. A vizsgálat során az e melléklet C.8. fejezetében (48) leírt mesterséges talajt ajánlott szubsztrátumként használni. A biológiai felhalmozódási vizsgálatokhoz való használatra szánt mesterséges talaj előállítását és a mesterséges talaj tárolására vonatkozó ajánlásokat a 4. függelék tartalmazza. A levegőn szárított mesterséges talaj a felhasználásig szobahőmérsékleten tárolható.

22. Szennyezésmentes helyről származó természetes talajok is szolgálhatnak a vizsgálathoz és/vagy a férgek tenyésztéséhez használt talajként. A természetes talajokat jellemezni kell legalább a következőkkel: származás (gyűjtés helye), pH, szerves széntartalom, részecskeméret-eloszlás (homok, iszap és agyag százalékaránya), maximális víztartó képesség (WHC_{max}) és százalékos víztartalom (3). A talajban, illetve a talajösszetevőkben található mikro-szennyező anyagok analízise a felhasználás előtt hasznos információkat szolgáltathat. Mezőgazdasági földterületről származó talaj használata esetén meg kell győződni arról, hogy a talajt nem kezelték növényvédőszerrel vagy kezelt állatoktól származó trágyával a mintavételt megelőző legalább egy évben, illetve szerves trágyával a mintavételt megelőző legalább fél évben (50). A természetes talajok kevéssertéjűekkel végzett ökotoxikológiai laboratóriumi vizsgálatok során történő felhasználás előtti kezelésének leírása a szakirodalomban megtalálható (3). A természetes talajokat a lehető legrövidebb ideig szabad csak a laboratóriumban tárolni.

A vizsgált anyag bevitele

23. A vizsgált vegyi anyagnak be kell épülnie a talajba. Ehhez figyelembe kell venni a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságait. Ha a vizsgált vegyi anyag vízben oldható, akkor a talajba keverés előtt vízben fel kell oldani. Vízben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok esetén egy vagy több (mesterséges) talajösszetevő vizsgált vegyi anyaggal való bevonása az ajánlott szennyezési eljárás. A kvarchomokot vagy annak egy részét például át lehet itatni a vizsgált vegyi anyag megfelelő szerves oldószerrel készített oldatával, amelyet aztán lassan elpárologtatunk, amíg a homok megszárad.

▼M4

Ezt követően a bevont részt össze lehet keverni a nedves talajjal. Ennek az eljárásnak az a legfőbb előnye, hogy a talajba nem kerül oldószer. Természetes talaj használata esetén a vizsgált vegyi anyag bejuttatásához szennyezhetjük a talaj egy levegőn szárított részét a vizsgált vegyi anyaggal a mesterséges talajra vonatkozóan az imént bemutatott módon, vagy a nedves talajba keverhetjük a vizsgált vegyi anyagot, majd a következő lépésben elpárologtatjuk az oldódást segítő szert, amennyiben ilyet használtunk. A nedves talaj oldószerekkel való érintkezését általában amennyire csak lehet kerülni kell. Figyelembe kell venni a következőket (3):

— Ha nem vizet használunk oldószerként, akkor olyan oldószert kell használni, amely vízzel elegyíthető, és/vagy eltávolítható (például elpárologtatható) úgy, hogy csak a vizsgált vegyi anyag maradjon a talajban.

— Az oldószer vizsgálatára szolgáló kontroll használata esetén negatív kontroll nem szükséges. Az oldószer vizsgálatára szolgáló kontroll edénynek a legnagyobb koncentrációban kell tartalmaznia a talajhoz adott oldószert, amelynek ugyanabból a tételből kell származnia, mint amelyet a törzsoldat készítéséhez használtunk. Az oldódást segítő megfelelő szer kiválasztásának fő szempontjai az oldószer toxikus hatása és illékonysága, valamint a vizsgált vegyi anyag választott oldószerben való oldhatósága.

24. Vízben és szerves oldószerekben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok esetén a kívánt vizsgálati koncentráció eléréséhez vizsgálati edényenként 2,0–2,5 g finomra őrölt kvarchomokot összedolgozhatunk a vizsgált vegyi anyag megfelelő mennyiségével például mozsárban. A kvarchomok és a vizsgált vegyi anyag e keverékét hozzáadjuk az előnedvesített talajhoz, és alaposan elkeverjük megfelelő mennyiségű ionmentesített vízzel úgy, hogy a szükséges nedvességtartalmat kapjuk. A végtermékként kapott keveréket elosztjuk a vizsgálati edények között. Az eljárást minden egyes vizsgálati koncentráció esetén megismételjük, és egy vizsgálati edényenként 2,0–2,5 g finomra őrölt kvarchomokot tartalmazó, megfelelő kontroll edényt is készítünk.

25. A szennyezést követően meg kell határozni a vizsgált vegyi anyag koncentrációját a talajban. A vizsgálathoz használt organizmusok behelyezése előtt ellenőrizni kell a vizsgált vegyi anyag homogén eloszlását a talajban. A szennyezési módszert és az adott szennyezési eljárás indoklását dokumentálni kell (24).

26. A talaj és a pórusvíz fázis közötti egyensúlynak ideális esetben a vizsgálathoz használt organizmusok behelyezése előtt be kell állnia; 20 °C hőmérsékleten erre négy napot ajánlott számítani. Számos vízben rosszul oldódó szerves vegyi anyag esetében az adszorbeálódott és oldott frakciók közötti valódi egyensúly eléréséhez napokra vagy hónapokra lehet szükség. A vizsgálat céljától függően, például ha a környezeti feltételeket kell utánozni, a mesterségesen szennyezett talaj hosszabb ideig „érlelhető”, például fémek esetében három héten keresztül 20 °C hőmérséklet mellett (22).

A vizsgálathoz használt organizmusok tenyésztése

27. A férgeket lehetőleg állandó laboratóriumi tenyészetben kell tartani. Az *Eisenia fetida* és az *Eisenia andrei*, valamint a televényféreg fajok laboratóriumi körülmények közötti tenyésztésének módszereire vonatkozóan az 5. függelék ad útmutatást (lásd még (48) (51) (52)).

28. A vizsgálathoz használt férgeken nem lehetnek megfigyelhető betegségek, rendellenességek és paraziták.

A VIZSGÁLAT ELVÉGZÉSE

29. A vizsgálathoz használt organizmusokat a felvételi fázisban tesszük ki a vizsgált vegyi anyag hatásának. A felvételi fázis 14 nap (televényférgeknél) vagy 21 nap (földigilisztáknál), kivéve, ha kimutatható, hogy az állandósult állapot elérése ennél előbb bekövetkezett.

▼M4

30. Az ürülési fázishoz a férgeket át kell helyezni a vizsgált vegyi anyagot nem tartalmazó talajba. Az első mintavételt az ürülési fázis kezdete után 4 – 24 órával kell végezni. A 21 napos felvételi fázisra és 21 napos ürülési fázisra vonatkozó mintavételi ütemtervekre a 3. függelék mutat be példákat.

A vizsgálathoz használt organizmusok

31. A szárazföldi televényférgek számos fajánál az egyedtömeg nagyon kicsi (például az *Enchytraeus albidus* esetében egy egyed nedves tömege 5–10 mg, az *Enchytraeus crypticus* vagy az *Enchytraeus luxuriosus* esetében pedig még kevesebb); a tömegmérések és a kémiai analízisek elvégzéséhez szükség lehet az egyes ismétlésekhez tartozó férgek együttes vizsgálatára (azaz az adott ismétléshez tartozó valamennyi férget fel kell használni ahhoz, hogy egyetlen analitikai szöveteredményt kapjunk). Minden egyes ismétléshez 20 televényféreg egyedet kell használni, és legalább három ismétlést kell alkalmazni. Ha a vizsgált vegyi anyag analitikai kimutathatósági határértéke magas, több féregre lehet szükség. Ha a vizsgálathoz nagyobb egyedtömeggel rendelkező fajokat használunk (*Eisenia fetida* és *Eisenia andrei*), akkor egy egyedet tartalmazó ismétlések is használhatók.

32. A vizsgálathoz hasonló tömegű földigilisztákat (például az *Eisenia fetida* és az *Eisenia andrei* esetében 250–600 mg tömegű egyedeket) kell használni. A televényférgeknek (például *Enchytraeus albidus*) körülbelül 1 cm hosszúnak kell lenniük. Az egy adott vizsgálathoz használt valamennyi féregnek ugyanabból a forrásból kell származnia, és kifejlett állatnak kell lennie, amelynél a nyereg (clitellum) már kialakult (lásd az 5. függeléket). Mivel az állatok tömege és kora hatással lehet a BAF értékekre (például az eltérő lipdtartalom és/vagy a peték jelenléte következtében), ezeket a paramétereket pontosan dokumentálni kell, és figyelembe kell venni az eredmények értelmezése során. Az expozíciós időszak alatt lerakott gubók is befolyásolhatják a BAF értékeket. Az átlagos nedves és a száraz tömeg becslése végett ajánlott a vizsgálat előtt lemérni a vizsgálathoz használt férgek egy részmintáját.

33. A talaj férgekhez viszonyított arányának elég nagynak kell lennie ahhoz, hogy a felvételi fázisban minél kevésbé csökkenjen a vizsgált vegyi anyag koncentrációja a talajban. *Eisenia fetida*, illetve *Eisenia andrei* használata esetén 50 g (száraz tömeg), a televényférgek esetében pedig 10–20 g (száraz tömeg) egy féregre jutó minimális talajmennyiség biztosítása ajánlott. Az edényeknek 2–3 cm (televényférgeknél), illetve 4–5 cm (földigilisztáknál) talajréteget kell tartalmazniuk.

34. A tenyészetből kivesszük a vizsgálathoz használni kívánt férgeket (például ékszerész csipesszel televényférgek használata esetén). A kifejlett állatokat nem kezelt kísérleti talajba helyezzük, hogy akklimatizálódjanak, és tápláljuk (lásd a 36. bekezdést). Ha a vizsgálati körülmények eltérnek a tenyésztési körülményektől, akkor 24–72 órás akklimatizálódási időszak szükséges ahhoz, hogy a férgek alkalmazkodjanak a vizsgálati körülményekhez. Az akklimatizációt követően a földigilisztákat tiszta vizet tartalmazó üvegedényekbe (például petri-csészékbe) helyezzük, és leöblítjük, majd azt követően lemérjük a tömegüket, mielőtt a vizsgálathoz használt talajba helyeznénk őket. A mérés előtt a férgeket finoman az edény széléhez kell ütögetni, vagy enyhén megnedvesített papírtörölközővel óvatosan meg kell őket töröl-getni, hogy a felesleges vizet eltávolíthassuk róluk.

35. A vizsgálathoz használt organizmusok viselkedését figyelni és dokumentálni kell. A földigilisztákkal végzett kísérletekben az állatok (a kontroll és a kezelt csoport egyaránt) akkor mutatnak normális viselkedést, ha néhány órán belül beássák magukat a talajba; ezt a férgek vizsgálati edényekbe való behelyezését követő 24 órán belül ellenőrizni kell. Ha a földigiliszták nem ássák be magukat a talajba (például a felvételi fázis félidejét több mint 10 %-kal meghaladó időszak elteltével), az vagy arra utal, hogy a vizsgálati

▼M4

körülmények nem megfelelők, vagy arra, hogy a vizsgálathoz használt organizmusok nem egészségesek. Ilyen esetben a vizsgálatot le kell állítani, és meg kell ismételni. A televényférgek főként a talajszemcsék közti pórusokban élnek, és kültakarójuk gyakran csak részben érintkezik a környező szubsztrátummal; a televényférgek esetében az expozíciót egyenértékűnek tételezzük fel függetlenül attól, hogy beássák-e magukat a talajba, vagy sem, és az utóbbi esetben a vizsgálatot nem feltétlenül szükséges megismételni.

Táplálás

36. Ha a vizsgálathoz használt talaj összes szerves széntartalma alacsony, akkor a férgeket táplálni kell. Mesterséges talaj használata esetén az ajánlott heti táplálékadag (amelyet hetente egyszer kell adni) a földigilisztáknál a talaj száraz tömegének minden grammjára 7 mg szárított istállótrágya, televényférgeknél pedig a talaj száraz tömegének minden grammjára 2–2,5 mg őrölt zabpehely (11). Az első táplálékadagot közvetlenül a vizsgálathoz használt organizmusok behelyezését követően kell a talajba keverni. Lehetőleg ugyanolyan típusú táplálékot kell használni, mint a tenyésztés során (lásd az 5. függeléket).

Fény és hőmérséklet

37. A vizsgálatot szabályozott, 16 órás világos és 8 órás sötét periódusból álló ciklusokat alkalmazva kell végezni, lehetőleg úgy, hogy a vizsgálati edények 400–800 lx fényt kapjanak (3). A vizsgálat teljes időszaka alatt 20 ± 2 °C hőmérsékletet kell biztosítani.

Vizsgálati koncentrációk

38. A vizsgálathoz egyetlen koncentrációt használunk. A további koncentráció(k) szükségességét indokolni kell. Az analitikai kimutathatósági határértékhez közeli toxicitású (EC_x) vegyi anyag vizsgálata esetén nagy fajlagos aktivitást biztosító radioaktív jelölésre van szükség. Fémek esetén a koncentrációnak a szövetre és a talajra jellemző háttérszint felett kell lennie.

Ismétlések

39. A kinetikai mérésekhez (a felvételi és az ürülési fázisban) mintavételi pontonként legalább három ismétlést kell alkalmazni minden egyes kezelt edény esetében. Összességében az ismétlésszámnak elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy a felvételi és az ürülési fázisban valamennyi mintavételt el lehessen végezni a megfelelő időpontban.

40. A biológiai megfigyelésekhez és mérésekhez (például a száraz és nedves tömeg aránya, lipidtartalom), valamint a férgek és a talaj háttér-koncentrációjának analíziséhez használt negatív kontrollok esetében legalább 12 ismétlés szükséges (négy a vizsgálat kezdetén, négy a felvételi fázis végén és négy az ürülési fázis végén végzett mintavételekhez), amennyiben a vízen kívül más oldószert nem használunk. Ha a vizsgált vegyi anyaggal való szennyezéshez oldódást segítő szert használtunk, akkor a kezelt ismétlések mellett a vizsgált vegyi anyagon kívül minden egyéb összetevőt tartalmazó kontrollokat is be kell állítani a szolubilizáló szer hatásának az ellenőrzésére (négy ismétlést a vizsgálat kezdetén, négyet a felvételi fázis végén és négyet az ürülési fázis végén végzett mintavételekhez). Ebben az esetben a negatív kontrollok esetében további négy ismétlésre (oldószert nem tartalmazó edények) lehet szükség a felvételi fázis végén végzett választható mintavételekhez. Ezek az ismétlések az oldószer kontrollal való biológiai összehasonlításra szolgálnak, amelyből az oldószer vizsgálathoz használt organizmusokra gyakorolt lehetséges hatásáról kaphatunk tájékoztatást. Ajánlatos elegendő számú (például nyolc) további tartalék ismétlést is biztosítani mind a kezelt, mind a kontroll edényekhez.

▼M4

A talajminőség-mérés gyakorisága

41. A vizsgálat kezdetén, valamint a felvételi és az ürülési fázisok végén meg kell mérni a talaj pH-ját és nedvességtartalmát, valamint a vizsgálat elvégzésére szolgáló helyiség (állandó) hőmérsékletét. A talaj nedvességtartalmát hetente egyszer ellenőrizni kell, amelyhez meg kell mérni a vizsgálati edények tömegét, és a tényleges értékeket össze kell hasonlítani a vizsgálat kezdetén mért kiindulási értékekkel. A vízveszteséget ionmentesített víz hozzáadásával pótolni kell.

A féreg- és talajminták gyűjtése és analízise

42. A földigilisztával és televényféreggel végzett biológiai felhalmozódási vizsgálatok felvételi és ürítési fázisaira vonatkozó ütemterv egy példáját a 3. függelék mutatja be.

43. A vizsgált vegyi anyag koncentrációjának a meghatározásához a férgek behelyezése előtt, valamint a felvételi és az ürülési fázis során talajmintákat kell venni a vizsgálati edényekből. A vizsgálat során meg kell határozni a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának alakulását a férgekben és a talajban. Általában a talajra jellemző összkoncentrációt szokás mérni. Kiegészítésképpen a pórusvízre jellemző koncentráció is mérhető; ebben az esetben a vizsgálat megkezdése előtt ki kell dolgozni az indoklást és a megfelelő módszereket, amelyeknek a jegyzőkönyvben is szerepelniük kell.

44. A felvételi és az ürülési fázis során legalább hat alkalommal kell féreg- és talajmintákat gyűjteni. Ha a vizsgált vegyi anyag stabilitása bizonyított, a talajanalízisek száma csökkenthető. A felvételi fázis kezdetén és végén ajánlott legalább három ismétlést analizálni. Ha a talajban mért koncentráció a felvételi fázis végén több mint 30 %-kal eltér a kezdeti koncentrációtól, akkor a más napokon vett talajmintákat is analizálni kell.

45. Minden egyes mintavétel alkalmával el kell távolítani a férgeket az adott edény talajtartalmából (például az edény talajtartalmát egy nem túl mély tálon szétterítjük, majd egy puha ékszerész csipesszel kiemeljük a férgeket), és vízzel gyorsan át kell öblíteni egy nem túl mély pohárban vagy acéltálban. A fölösleges vizet el kell távolítani (lásd a 34. bekezdést). A férgeket óvatosan át kell helyezni egy előre lemért edénybe, majd azonnal le kell mérni a béltartalommal együtt.

46. Ezt követően hagyni kell, hogy a földigiliszták (*Eisenia* sp.) az éjszaka folyamán kiürítsék a béltartalmukat, például egy lefedett petri-csészében elhelyezett nedves szűrőpapíron (lásd a 34. bekezdést). A béltartalom ürítését követően a biomassza vizsgálat időszaka alatti esetleges csökkenésének az értékelése céljából meg kell határozni a férgek tömegét (lásd az érvényességi kritériumokat a 17. bekezdésben). A televényférgek tömegének mérését és szövetelemzését a béltartalom ürítése nélkül kell elvégezni, ám ez a férgek kis mérete miatt technikailag nehezen lenne kivitelezhető. A végleges tömeg meghatározását követően a férgeket azonnal el kell pusztítani a lehető legmegfelelőbb módszert alkalmazva (például folyékony hidrogénnel vagy –18 °C alatti hőmérsékletre történő fagyasztással).

47. Az ürülési fázis során a férgek szennyezett béltartalma tiszta talajra cserélődik. Ez azt jelenti, hogy ha a közvetlenül az ürülési fázis előtt vett mintában szereplő férgeken a béltartalom ürítése nélkül végezzük el a méréseket (televényférgek esetében), akkor azok a szennyezett talajból álló béltartalmat is tartalmazni fogják. A vízi kevéssertéjűek esetében azt feltételezzük, hogy az ürülési fázis első 4–24 órájában a szennyezett béltartalom nagy része tiszta üledékre cserélődik, például (46). Földigiliszták esetében hasonló eredmények születtek a radioaktívan jelölt kadmium és cink felhalmozódására vonatkozó vizsgálatok során (78). A televényférgek esetében az ürülési fázisban elsőként vett mintában mért koncentrációt lehet a béltartalom kiürülése utáni szövetkoncentrációnak tekinteni. Annak ellensúlyozása végett, hogy a vizsgált vegyi anyag koncentrációja a nem szennyezett talaj általi hígítás miatti csökkenhet az ürülési fázisban, a béltartalom tömegét a férgek nedves tömegének az elpusztult férgek tömegéhez viszonyított aránya, illetve a férgek száraz tömegének az elpusztult férgek tömegéhez viszonyított aránya alapján is meg lehet becsülni.

▼M4

48. A lebomlás vagy egyéb veszteségek elkerülése érdekében a talaj- és féregmintákat lehetőleg közvetlenül az edényből való eltávolítást követően (vagyis 1–2 napon belül) kell analizálni, és ajánlott közelítő felvételi és ürülési sebesség értékeket számítani, ahogy a vizsgálat halad előre. Ha az analízist késleltetni kell, akkor a mintákat megfelelő módszert alkalmazva, például mélyhűtve (≤ -18 °C) kell tárolni.

49. Ellenőrizni kell, hogy a kémiai analízis pontossága és reprodukálhatósága, valamint a vizsgált vegyi anyag talaj- és féregmintákból való visszanyerése megfelel az adott módszernek; dokumentálni kell az extrakciós hatékonyságot, a kimutathatósági határértéket (LOD) és a mennyiségi meghatározás határértékét (LOQ). Hasonlóképpen ellenőrizni kell, hogy a vizsgált vegyi anyag nem mutatható ki a háttérnél nagyobb koncentrációban a kontroll edényekben. Ha a vizsgált vegyi anyag koncentrációja a vizsgálathoz használt organizmusokban (C_a) a kontroll férgek esetében nagyobb, mint 0, ezt a kinetikai paraméterek számításánál figyelembe kell venni (lásd a 2. függeléket). A vizsgálat során a mintákat mindvégig úgy kell kezelni, hogy a szennyeződés és a veszteség (például a vizsgált vegyi anyag mintavevő eszközön való adszorbeálódása következtében) a lehető legkisebb mértékű legyen.

50. Radioaktívan jelölt vizsgált vegyi anyagok használata esetén lehetőség van a kiindulási anyag és a metabolitok analízisére. A vizsgált kiindulási vegyi anyag és a metabolitok mennyiségi meghatározása az állandósult állapotban vagy a felvételi fázis végén fontos információkat szolgáltat. A mintákat ezt követően „meg kell tisztítani”, hogy a vizsgált kiindulási vegyi anyag mennyisége külön is meghatározható legyen. Ajánlott azonosítani azokat a metabolitokat, amelyek önmagukban meghaladják az analizált minta (minták) összes radioaktivitásának 10 %-át.

51. Dokumentálni és a jegyzőkönyvben is szerepeltetni kell az összes visszanyerést, a vizsgált vegyi anyag visszanyerését a férgekben, a talajban és – ha a vizsgálatban szerepelnek – az elpárolgott vizsgált anyag elnyelésére szolgáló abszorbenst tartalmazó csapdákban.

52. Az adott vizsgálati edényből vett mintában szereplő egyedek összevonása a földigilisztánál kisebb televényférgek használata esetén elfogadható. Az ismétlések számának csökkenésével járó összevonás azonban korlátozza az adatok feldolgozására alkalmazható statisztikai eljárásokat. Ha egy adott statisztikai eljárást kell alkalmazni, vagy a próba erejének el kell érnie egy bizonyos szintet, akkor a vizsgálat során olyan számú ismétlést kell alkalmazni, amely a kívánt összevonás mellett az ezeknek a követelményeknek való megfelelést is biztosítja.

53. A BAF értékét ajánlott egyaránt kifejezni az összes száraz súly függvényében és – ha szükséges (azaz erősen hidrofób vegyi anyagok esetén) – a lipidtartalom függvényében. A lipidtartalom meghatározására megfelelő módszereket kell alkalmazni (egyes létező módszerek – például (31) (58) – e célra történő adaptálásával). Ezek a módszerek a kloroform/metanol extrakciós technikára épülnek. A klórozott oldószerek használata azonban kerülendő, a Bligh- és Dyer-féle módszer (9) szakirodalomban (17) leírt módosítását kell alkalmazni. Mivel előfordulhat, hogy a különböző módszerek eltérő értékeket eredményeznek, az alkalmazott módszert részletesen ismertetni kell. Amennyiben lehetséges, vagyis ha elegendő féregszövet áll rendelkezésre, akkor a lipidanalízist a vizsgált anyag analíziséhez használttal azonos mintán vagy extraktumon kell elvégezni, mivel a lipideket gyakran el kell távolítani az extraktumból ahhoz, hogy kromatográfiás módszerrel analizálható legyen (49). A másik lehetőség, hogy kontroll állatokat használunk a lipidtartalom mérésére, amelyre majd a BAF értékeket vonatkoztathatjuk. Ha ezt az utóbbi megközelítést használjuk, akkor a felszerelés kevésbé szennyeződik a vizsgált vegyi anyaggal.

▼M4

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVVEZETÉS

Az eredmények kezelése

54. A vizsgált anyag felvételi görbéje az idő függvényében, aritmetikus skálán ábrázolja a vizsgált anyag férgekben/férgeken mért koncentrációjának alakulását a felvételi fázisban. Amennyiben a görbe kiegyenesedett, vagyis elérte az állandósult állapotot (a meghatározásokat lásd az 1. függelékben), az állandósult állapothoz tartozó BAF_{ss} biológiai felhalmozódási tényezőt a következőképpen kell kiszámítani:

$$\frac{C_a \text{ az állandósult állapotban vagy a felvételi fázis végén (középérték)}}{C_s \text{ az állandósult állapotban vagy a felvételi fázis végén (középérték)}}$$

C_a a vizsgált vegyi anyag koncentrációja a vizsgálathoz használt organizmusban

C_s a vizsgált vegyi anyag koncentrációja a talajban

55. Ha nem állt be az állandósult állapot, akkor a BAF_{ss} helyett a kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőt (BAF_K) kell kiszámítani a sebességi állandók alapján, az alábbiak szerint:

— A BAF_K-t a k_s és a k_e hányadosaként kell meghatározni.

— A felvételi és az ürülési sebességet lehetőleg párhuzamosan kell kiszámítani (lásd a 11. egyenletet a 2. függelékben).

— Az ürülési sebességi állandó (k_e) meghatározása általában az ürülési görbe alapján történik (amely a vizsgált tétel férgekben mért koncentrációjának az alakulását ábrázolja az ürülési fázisban). Ezt követően a felvételi sebességi állandó kiszámítható a k_e adott értékéből, valamint a C_a felvételi görbéből levezetett értékéből – ezeknek a módszereknek a leírását lásd a 2. függelékben. A BAF_K és a sebességi állandók meghatározásához lehetőleg számítógéppel végzett nemlineáris paraméterbecslést kell használni. Ha az ürülés folyamata nyilvánvalóan nem az elsőrendű kinetikát követi, akkor összetettebb modelleket kell alkalmazni.

Vizsgálati jegyzőkönyv

56. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— A vizsgált vegyi anyag talajban élő kevéssertéjűekre gyakorolt akut vagy hosszú távú toxikus hatására vonatkozóan rendelkezésre álló információk (például EC_x, LC_x, NOEC)

— kémiai tisztaság, fizikai jelleg, valamint fizikai és kémiai tulajdonságok, például log K_{ow}, vízben való oldhatóság,

— kémiai azonosító adatok; a vizsgált tétel származása, a használt oldószer meghatározása és koncentrációja,

— radioaktívan jelölt vizsgált vegyi anyag használata esetén a jelölt atomok pontos elhelyezkedése, a fajlagos radioaktivitás és a radiokémiai tisztaság.

A vizsgálathoz felhasznált faj:

— tudományos név, törzs, származás, esetleges előkezelés, akklimatizáció, életkor, mérettartomány, stb.

▼M4

Vizsgálati körülmények:

— az alkalmazott vizsgálati eljárás,

— az alkalmazott megvilágítás típusa és jellemzői, valamint a fényperiódus(ok),

— a vizsgálat kialakítása (például vizsgálati edények száma és mérete, talajtömeg és a talajréteg magassága, ismétlések száma, egy ismétlésre jutó férgek száma, vizsgálati koncentrációk száma, a felvételi és az ürítési fázisok időtartama, mintavételi gyakoriság),

— a vizsgálati edény anyagának indoklása,

— a vizsgálati tétel előkészítése és alkalmazása, valamint az adott módszer választásának okai,

— a névleges vizsgálati koncentrációk, a vizsgálati edényekben mért értékek középértékei és szórásuk, valamint az ezen értékek előállításának módszere,

— a mesterséges talaj összetevőinek a forrása vagy – természetes közeg használata esetén – a talaj származása, esetleges előkezelés leírása, kontroll eredmények (túlélés, biomassza képződés, szaporodás), a talaj jellemzői (pH, összes szerves széntartalom, részecskeméret-eloszlás (homok, iszap és agyag százalékaránya), WHC_{max}, százalékos víztartalom a vizsgálat elején és végén, valamint az elvégzett egyéb mérések),

— a talaj- és féregminták kezelésének részletes bemutatása, beleértve az előkészítés részleteit, a tárolást, a szennyezési eljárásokat, az extrakciót és az analitikai eljárásokat (és pontosságukat) a férgekre és a talajra vonatkozóan, valamint a lipidtartalmat (ha a mérése szerepelt a vizsgálatban) és a vizsgált tétel visszanyerését.

Eredmények:

— a férgek mortalitása a kontroll és az egyes vizsgálati edényekben, bármely megfigyelt rendellenes viselkedés (például talajkerülés, televényférgekkel végzett biológiai felhalmozódási vizsgálat esetén a szaporodás hiánya),

— a talaj és a vizsgálathoz használt organizmusok száraz és nedves tömegének az aránya (hasznos a viszonyításhoz),

— a férgek nedves tömege az egyes mintavételi időpontokban; földigilisztáknál a vizsgálat kezdetén és az egyes mintavételi időpontokban a béltartalom ürítése előtt és után mért nedves tömeg,

— a vizsgálathoz használt organizmusok lipidtartalma (ha meghatározásra került),

— a vizsgált vegyi anyag férgek általi felvételének és férgekből való kiürülésének kinetikáját ábrázoló görbék, valamint az állandósult állapot eléréséhez szükséges idő,

— a mintavételi időpontokhoz tartozó C_a és C_s (szórással és tartománnyal együtt, esettől függően) (a C_a a férgek nedves és száraz tömegének kg-jára jutó g-ban, a C_s a talaj nedves és száraz tömegéhez kg-jára jutó g-ban kifejezve). Ha a bióta-talaj felhalmozódási tényezőt (BSAF) is meg kell határozni (például a különböző lipidtartalmú állatokkal végzett kettő vagy több vizsgálat eredményeinek az összehasonlítása céljára), a C_a az organizmus lipidtartalmának kg-jára jutó g-ban, a C_s pedig a talaj szerves szén (OC) tartalmának kg-jára jutó g-ban is kifejezhető,

— ezeken kívül a jegyzőkönyvben szerepelhet még a BAF (amely azt fejezi ki, hogy a talaj hány grammja jut a férgek kilogrammjára), a talajból való felvétel sebességi állandója (amely azt fejezi ki, hogy egy napra vetítve a talaj hány grammja jut a férgek kilogrammjára), valamint a k_e ürülési sebességi állandó (amely az egy napra jutó ürülés mértékét fejezi ki); a BSAF (amely azt fejezi ki, hogy a talaj szerves széntartalmának hány kilogrammja jut a férgek lipidtartalmának egy kilogrammjára),

▼M4

— ha a vizsgálatban a mérése szerepelt, a következők talajban és a vizsgálathoz használt állatokban kimutatott százaléka: a kiindulási vegyi anyag, a metabolitok és a megkötött maradványok (azaz a vizsgált vegyi anyag közönséges extrakciós módszerekkel nem kinyerhető százaléka),

— az adatok statisztikai elemzéséhez használt módszerek.

Az eredmények értékelése:

— az eredmények megfelelése a 17. bekezdésben felsorolt érvényességi kritériumoknak,

— nem várt vagy szokatlan eredmények, például a vizsgált vegyi anyag nem teljes mértékű kiürülése a vizsgálathoz használt állatokból.

SZAKIRODALOM

(1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

(2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

(3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 pp.

(4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235–276.

(5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93–99.

(6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154–165.

(7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185–191.

(8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1–13.

(9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911–917.

(10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.

(11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

(12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185–196.

(13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. J. Soils Sediments 3: 13–20.

▼M4

(14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91–100.

(15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2–29.

(16) Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pp. 555–576.

(17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140–145.

(19) Az Európai Parlament és a Tanács 2006. December 18-I 1907/2006/EK rendelete a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH), az Európai Vegyianyag-ügynökség létrehozásáról, az 1999/45/EK irányelv módosításáról, valamint a 793/93/EGK tanácsi rendelet, az 1488/94/EK bizottsági rendelet, a 76/769/EGK tanácsi irányelv, a 91/155/EGK, a 93/67/RGK, a 93/105/EK és a 2000/21/EK bizottsági irányelv hatályon kívül helyezéséről, HL L 396., 2006.12.30., 1. o.

(20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

(21) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Available for download at: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

(23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

(24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195–208.

(26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897–1905.

(27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501–1514.

(28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

(29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF – Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78–84.

(30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225–1231.

(31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099–1105.

(32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701–707.

(33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15–20.

(34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59–81.

(35) ISO 11268-2 (1998) Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földigilisztára (*Eisenia fetida*). 2. rész: A reprodukciós hatások meghatározása.

(36) Jaenike J (1982). „*Eisenia foetida*" is two biological species. Megadrilogica 4: 6–8.

(37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080–2090.

(38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953–961.

(39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767–775.

(40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399–3404.

(41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305–312.

(42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217–232.

(43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

(44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588–595.

(45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17–26.

(46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244–1249.

▼M4

(47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) E melléklet C.8. fejezete: Toxicitás földigilisztákra.

(49) E melléklet C.13. fejezete: Biokoncentráció vizsgálata: átfolyásos hal vizsgálat.

(50) E melléklet C.21. fejezete: Talajlakó mikroorganizmusok: nitrogén-átalakítási vizsgálat.

(51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(52) OECD (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287–388.

(55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378–396.

(56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77–81.

(57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

(58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431–1436.

(59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

(60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.

(61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105–129.

(62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107–127.

(63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110–2120.

(64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413–433.

(65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

(66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

(68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309–320.

(69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67–81.

(70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta.* Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167–1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation – Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

(72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277–285.

(74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023–1033.

(76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409–417.

(77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161–165.

(78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843–1851.

(79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

▼M4

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Biológiai felhalmozódás: a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának növekedése egy szervezetben/szervezeten a vizsgált vegyi anyagnak a környező közegben lévő koncentrációjához viszonyítva. A biológiai felhalmozódás biokoncentrációs és biomagnifikációs folyamatok eredménye (lásd lentebb).

Biokoncentráció: a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának növekedése egy szervezetben/szervezeten – a vegyi anyagnak kizárólag a környező közegből való (vagyis a testfelületen keresztüli és talajemésztéssel történő) felvétele eredményeként – a vizsgált vegyi anyagnak a környező közegben lévő koncentrációjához viszonyítva.

Biomagnifikáció: a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának növekedése egy szervezetben/szervezeten – kizárólag szennyezett táplálékból vagy zsákmányállatból való felvétel eredményeként – a vizsgált vegyi anyagnak a szennyezett táplálékban vagy zsákmányállatban lévő koncentrációjához viszonyítva. A biomagnifikáció a vizsgált tétel táplálékhálón belüli átadásához vagy felhalmozódásához vezethet.

Ürülés: a vizsgált vegyi anyag kiürülése a vizsgálathoz használt organizmus szövetéből aktív vagy passzív folyamatok eredményeként, amelyek a vizsgált vegyi anyag környező közegben való jelenlététől vagy hiányától függetlenül mennek végbe.

Biológiai felhalmozódási tényező (BAF): a vizsgált vegyi anyag biológiai felhalmozódási vizsgálat felvételi fázisának bármely időpontjában a vizsgálathoz használt organizmusban/organizmuson mért koncentrációjának (C_a, a férgek száraz tömegének kg-jára jutó grammban kifejezve) és a vegyi anyag környező közegben lévő koncentrációjának a hányadosa (C_s, a talaj száraz tömegének kg-jára jutó grammban kifejezve); a BAF azt fejezi ki, hogy a talaj hány kilogrammja jut a férgek egy kilogrammjára.

Állandósult állapothoz tartozó biológiai felhalmozódási tényező (BAF_{ss}): az állandósult állapothoz tartozó BAF, amely nem változik jelentősen egy hosszabb időtartamon keresztül, amely alatt a vizsgált vegyi anyag koncentrációja a környező közegben (C_s, a talaj száraz tömegének kg-jára jutó grammban kifejezve) állandó.

A közvetlenül a talajból való felvétel sebességi állandója és az ürülési sebességi állandó (k_s és k_e, lásd lentebb) hányadosából számított **biológiai felhalmozódási tényezőt** kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőnek (BAF_K) nevezzük.

Bióta-talaj felhalmozódási tényező (BSAF): a vizsgált vegyi anyag vizsgálathoz használt organizmusban/organizmuson mért, lipidtartalomra vonatkoztatott koncentrációjának és a vizsgált vegyi anyag talajban mért, szerves széntartalomra vonatkoztatott koncentrációjának a hányadosa az állandósult állapotban. A C_a-t az organizmus lipidtartalmának kilogrammjára jutó grammban, a C_s-t a talaj szerves széntartalmának kilogrammjára jutó grammban fejezzük ki; a BSAF azt fejezi ki, hogy a talaj szerves széntartalmának hány kilogrammja jut a férgek lipidtartalmának egy kilogrammjára.

Állandósult állapot vagy **platό**: az expozíciós fázisban párhuzamosan végbemenő felvételi és ürülési folyamatok közötti egyensúly. Az állandósult állapot akkor következik be, amikor a BAF alakulását az idő függvényében ábrázoló görbe párhuzamossá válik az időtengellyel, és a legalább kétnapos időközönként vett három egymást követő mintán végzett BAF analízis eredménye 20 %-nál kisebb eltérést mutat, és a három mintavételi időszak nem mutat statisztikailag számottevő eltéréseket. Ha a vizsgált vegyi anyag felvétele lassú, helyénvalóbb lehet a hétnapos időközök alkalmazása (49).

Szerves szén – víz megoszlási hányados (K_{oc}): a vegyi anyag talaj szerves szén frakciójában/frakcióján és vízben mért koncentrációjának a hányadosa az egyensúlyi állapotban.

Oktanol – víz megoszlási hányados (K_{ow}): a vegyi anyag n-oktanolban és vízben való oldhatóságának a hányadosa az egyensúlyi állapotban, esetenként P_{ow}-val is jelölik. A vegyi anyag vízi szervezetekben való felhalmozódási képességének kifejezésére a K_{ow} logaritmusát ($\log K_{ow}$) használjuk.

▼**M4**

Felvételi vagy expozíciós fázis: azt az időtartamot jelöli, amelyen keresztül a vizsgálathoz használt organizmusok ki vannak téve a vizsgált vegyi anyag hatásának.

Talajból való felvétel sebességi állandója (k_s): a vizsgált tétel vizsgálathoz használt organizmusban/organizmuson mért koncentrációjának a vizsgált tétel talajfázisból való felvétele eredményeként bekövetkező növekedésének az ütemét meghatározó számérték. A k_s azt fejezi ki, hogy egy napra vetítve a talaj hány grammja jut a férgek kilogrammjára.

Ürülési fázis: azt az időtartamot jelöli, amelyen keresztül a vizsgált vegyi anyag vizsgálathoz használt organizmusokból való kiürülését (vagy a vizsgálathoz használt organizmusokban való nettó csökkenését) vizsgáljuk a vizsgálathoz használt organizmusok szennyezett közegből a vizsgált anyagot nem tartalmazó közegbe való áthelyezését követően.

Ürülési sebességi állandó (k_e): a vizsgált tétel vizsgálathoz használt organizmusban/organizmuson mért koncentrációjának a vizsgálathoz használt organizmusok vizsgált anyagot tartalmazó közegből a vizsgált anyagot nem tartalmazó közegbe való áthelyezését követő csökkenésének az ütemét meghatározó számérték; a k_e az egy napra jutó ürülés mértékét fejezi ki.

Vizsgált vegyi anyag: Bármely, ennek a vizsgálati módszernek az alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

▼M4

2. függelék

A felvételi és az ürülési paraméterek kiszámítása

A biológiai felhalmozódási vizsgálatok fő végpontja a biológiai felhalmozódási tényező (BAF). A BAF értéke az állandósult állapotban a vizsgálathoz használt organizmusban mért koncentráció (C_a) és a talajban mért koncentráció (C_s) hányadosaként számítható ki. Ha a felvételi fázisban nem következik be az állandósult állapot, az állandósult állapothoz tartozó biológiai felhalmozódási tényező (BAF_{ss}) helyett a kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőt (BAF_K) kell kiszámítani a sebességi állandókból. Jelezni kell azonban, hogy a BAF az állandósult állapothoz tartozó koncentrációkon alapul-e vagy sem.

A BAF_K, a talajból való felvétel sebességi állandója (k_s) és az ürülési sebességi állandó (k_e) meghatározása általában számítógéppel végzett nemlineáris paraméterbecsléssel történik, például a szakirodalomban (68) leírt modellek alapján. Ezek a számítógépes programok az egymást követő időpontokban gyűjtött koncentráció adatokból és a következő modellegyenletekből számítják ki a BAF_K, a k_s és a k_e értékeit:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[1. egyenlet]}$$

vagy

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[2. egyenlet]}$$

ahol:

C_a = a vegyi anyag koncentrációja a férgekben [nedves vagy száraz tömeg kg-jára jutó g]

k_s = szövetben való felvételi sebességi állandó [a talaj egy napra vetítve a férgek kg-jára jutó grammja]

C_s = a vegyi anyag koncentrációja a talajban [nedves vagy száraz tömeg kg-jára jutó g]

k_e = ürülési sebességi állandó [1/nap]

t_c = a felvételi fázis végének időpontja

Ha a vizsgált vegyi anyag hatásának ki nem tett férgekben a háttér-koncentráció – például a 0. napon – jelentős mértékben eltér a nullától (ez például fémek esetén fordulhat elő), akkor a háttér-koncentrációt ($C_{a,0}$) bele kell foglalni az egyenletekbe, amelyek így a következők:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[3. egyenlet]}$$

és

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[4. egyenlet]}$$

Ha a felvételi fázisban a vizsgált vegyi anyag koncentrációja a talajban jelentős csökkenést mutat, akkor a következő modellek alkalmazhatók (például (67) (79)):

$$C_s = C_0(e^{-k0^{t}}) \qquad \text{[5. egyenlet]}$$

▼M4

ahol:

C_s = a vegyi anyag koncentrációja a talajban [nedves vagy száraz tömeg kg-jára jutó g]

k_0 = talajban való lebomlás sebességi állandója [1/nap]

C_0 = a vegyi anyag kezdeti koncentrációja a talajban [nedves vagy száraz tömeg kg-jára jutó g]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[6. egyenlet]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[7. egyenlet]}$$

ahol:

C_a = a vegyi anyag koncentrációja a férgekben [nedves vagy száraz tömeg kg-jára jutó g]

k_s = szövetben való felvételi sebességi állandó [a talaj egy napra vetítve a férgek kg-jára jutó grammja]

k_0 = talajban való lebomlás sebességi állandója [1/nap]

k_e = ürülési sebességi állandó [1/nap]

t_c = a felvételi fázis végének időpontja.

Amennyiben a felvételi fázis alatt beáll az állandósult állapot (vagyis $t = \infty$), az 1. egyenlet

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[1. egyenlet]}$$

leegyszerűsíthető a következőképpen:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

vagy

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[8. egyenlet]}$$

Ezt követően a vizsgált tétel állandósult állapothoz tartozó koncentrációja a féregszövetben ($C_{a,ss}$) kiszámítható a k_s/k_e x C_s képlettel.

A bióta-talaj felhalmozódási tényező (BSAF) a következőképpen számítható ki:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[9. egyenlet]}$$

ahol f_{oc} a szerves szén frakció a talajban, f_{lip} pedig a lipid frakció a féregben, amelyeket lehetőleg a vizsgálat során gyűjtött mintákon kell meghatározni a száraz, illetve a nedves tömeg alapján.

Az ürülés kinetikája az ürülési fázisból származó adatokból, az alábbi modellegyenlet és számítógépes nemlineáris paraméterbecslés alkalmazásával modellezhető. Ha az idő függvényében ábrázolt adatpontok a vizsgált tétel állatokban mért koncentrációjának folyamatos exponenciális csökkenését jelzik, akkor az ürülés időbeli alakulása egyrekeszes modellel (9. egyenlet) jellemezhető.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[10. egyenlet]}$$

▼**M4**

Az ürülési folyamatok esetenként kétfázisúak, azaz a korai fázisban a C_a gyors csökkenése figyelhető meg, amelyet az ürülés későbbi fázisaiban a vizsgált tételek koncentrációjának lassúbb csökkenése vált fel, például (27) (68). A két fázis azzal a feltevéssel értelmezhető, hogy a szervezet két különböző részből áll, amelyekből eltérő sebességgel ürül ki a vizsgált tétel. Ebben az esetben tanulmányozni kell a vonatkozó szakirodalmat, például (38) (39) (40) (78).

A fenti modellegyenletekkel egyszerre is kiszámíthatók a kinetikai paraméterek (k_s és k_e), ha az elsőrendű kinetikai modellt a felvételi és az ürülési fázisból származó valamennyi adatra egyidejűleg alkalmazzuk. A felvételi és az ürülési sebességi állandók együttes kiszámítását lehetővé tévő módszer leírása a szakirodalomban (41), (73) és (70) megtalálható.

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[11. egyenlet]}$$

Megjegyzés: A felvételi és ürülési paraméterek egyesített felvételi és ürülési adatokból történő egyidejű becslése esetén a 11. egyenletben az „m” deszkriptor teszi lehetővé a számítógépes program számára az egyenletben szereplő résztényezők hozzárendelését az adott fázishoz tartozó adathalmazokhoz és az értékelés helyes elvégzését (a felvételi fázis esetén m = 1; az ürülési fázis esetén m = 2).

Mindazonáltal ezeket a modellegyenleteket kellő körültekintéssel kell használni, különösen akkor, ha a vizsgált vegyi anyag biológiai hozzáférhetősége vagy (biológiai) lebomlása a vizsgálat folyamán változik (lásd például (79)).

▼M4

3. függelék

PÉLDÁK A TALAJBÓL FELVETT VIZSGÁLT VEGYI ANYAG BIOLÓGIAI FELHALMOZÓDÁSA VIZSGÁLATÁNAK ÜTEMTERVÉRE

Földigilisztával végzett vizsgálat

a) Felvételi fázis 8 különböző napon történő mintavétellel a kinetikai számítások céljára

Nap	Tennivaló
– 6	Az elkészített talaj kondicionálása 48 órán keresztül,
– 4	A talajfrakció szennyezése a vizsgált vegyi anyag oldatával; az esetlegesen használt oldószer elpárologtatása; a talajösszetevők összekeverése; a talaj szétosztása a vizsgálati edényekben; ekvilibráció 4 napon keresztül a vizsgálati körülmények között (fémmel szennyezett talaj esetén 3 napon keresztül),
– 3 – – 1	A vizsgálathoz felhasználandó organizmusok kiemelése az akklimatizációs tenyészetből; a talajösszetevők előkészítése és nedvesítése,
0	a hőmérséklet és a talaj pH-jának mérése; talajminták gyűjtése a kezelt edényekből és az oldószer kontrollokból a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának a meghatározásához; táplálékadag adása; a férgek tömegének lemérése és a férgek véletlenszerű elosztása a vizsgálati edények között; elegendő féreg-alminta elkülönítése az analitikai háttérértékek, a nedves és száraz tömeg, valamint a lipidtartalom meghatározásához; a vizsgálati edények tömegének lemérése a talaj nedvességtartalmának az ellenőrzése végett; zárt vizsgálati elrendezés használata esetén a levegőellátás ellenőrzése,
1	A levegőellátás ellenőrzése, a férgek viselkedésének és a hőmérsékletnek a dokumentálása; talaj- és féregminták gyűjtése a vizsgált tétel koncentrációjának a meghatározásához,
2	Ugyanaz, mint az 1. napon,
3	A levegőellátás ellenőrzése, a férgek viselkedésének és a hőmérsékletnek a dokumentálása,
4	Ugyanaz, mint az 1. napon,
5 – 6	Ugyanaz, mint a 3. napon,
7	Ugyanaz, mint az 1. napon; táplálékadag adása; a vizsgálati edények tömegének ismételt lemérése a talaj nedvességtartalmának ellenőrzésére, és az elpárolgott víz pótlása,
8 – 9	Ugyanaz, mint a 3. napon,
10	Ugyanaz, mint az 1. napon,
11 – 13	Ugyanaz, mint a 3. napon,
14	Ugyanaz, mint az 1. napon; táplálékadag adása; a vizsgálati edények tömegének ismételt lemérése a talaj nedvességtartalmának ellenőrzésére, és az elpárolgott víz pótlása,
15 – 16	Ugyanaz, mint a 3. napon,
17	Ugyanaz, mint az 1. napon,
18 – 20	Ugyanaz, mint a 3. napon,

▼**M4**

Nap	Tennivaló
21	Ugyanaz, mint az 1. napon; a hőmérséklet és a talaj pH-jának mérése; a vizsgálati edények tömegének ismételt lemérése a talaj nedvességtartalmának ellenőrzésére; a felvételi fázis vége; a férgek áthelyezése a fennmaradó expozíciós edényekből tiszta talajt tartalmazó edényekbe az ürítési fázishoz (béltartalom-ürítés nélkül); talaj- és féregminták gyűjtése az oldószer kontrollokból.
	Az expozíció előtti tennivalókat (ekvilibrációs fázis) a vizsgált vegyi anyag tulajdonságainak a figyelembevételével kell ütemezni.
	A 3. napnál leírt tennivalókat minden nap el kell végezni (legalább munkanapokon).

b) Ürülési fázis

Nap	Tennivaló
– 6	A talajösszetevők előállítása és nedvesítése; az elkészített talaj kondicionálása 48 órán keresztül,
– 4	A talajösszetevők összekeverése; a talaj szétosztása a vizsgálati edényekben; inkubálás 4 napon keresztül a vizsgálati körülmények között,
0 (a felvételi fázis vége)	A hőmérséklet és a talaj pH-jának mérése; a férgek tömegének lemérése és a férgek véletlenszerű elosztása a vizsgálati edények között; táplálékadag adása; a férgek áthelyezése a fennmaradó expozíciós edényekből tiszta talajt tartalmazó edényekbe; talaj- és féregminták gyűjtése 4 – 6 óra elteltével a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának a meghatározásához,
1	A levegőellátás ellenőrzése, a férgek viselkedésének és a hőmérsékletnek a dokumentálása; talaj- és féregminták gyűjtése a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának a meghatározásához,
2	Ugyanaz, mint az 1. napon,
3	A levegőellátás ellenőrzése, a férgek viselkedésének és a hőmérsékletnek a dokumentálása,
4	Ugyanaz, mint az 1. napon,
5–6	Ugyanaz, mint a 3. napon,
7	Ugyanaz, mint az 1. napon; táplálékadag adása; a vizsgálati edények tömegének ismételt lemérése a talaj nedvességtartalmának ellenőrzésére, és az elpárolgott víz pótlása,
8–9	Ugyanaz, mint a 3. napon,
10	Ugyanaz, mint az 1. napon,
11–13	Ugyanaz, mint a 3. napon,
14	Ugyanaz, mint az 1. napon; táplálékadag adása; a vizsgálati edények tömegének ismételt lemérése a talaj nedvességtartalmának ellenőrzésére, és az elpárolgott víz pótlása,
15–16	Ugyanaz, mint a 3. napon,
17	Ugyanaz, mint az 1. napon,

▼M4

Nap	Tennivaló
18–20	Ugyanaz, mint a 3. napon,
21	Ugyanaz, mint az 1. napon; a hőmérséklet és a talaj pH-jának mérése; a vizsgálati edények tömegének ismételt lemérése a talaj nedvességtartalmának ellenőrzésére; talaj- és féregminták gyűjtése az oldószer kontrollokból.
	Az ürülési fázis kezdete előtt ugyanúgy kell előkészíteni a talajt, mint a felvételi fázis előtt.
	A 3. napnál leírt tennivalókat minden nap el kell végezni (legalább munkanapokon).

Televényféreggel végzett vizsgálat

a) Felvételi fázis 8 különböző napon történő mintavétellel a kinetikai számítások céljára

Nap	Tennivaló
– 6	Az elkészített talaj kondicionálása 48 órán keresztül,
– 4	A talajfrakció szennyezése a vizsgált vegyi anyag oldatával; az esetlegesen használt oldószer elpárologtatása; a talajösszetevők összekeverése; a talaj szétosztása a vizsgálati edényekben; ekvilibráció 4 napon keresztül a vizsgálati körülmények között (fémmel szennyezett talaj esetén 3 napon keresztül),
– 3 – – 1	A vizsgálathoz felhasználandó organizmusok kiemelése az akklimatizációs tenyészetből; a talajösszetevők előkészítése és nedvesítése,
0	a hőmérséklet és a talaj pH-jának mérése; talajminták gyűjtése a kezelt edényekből és az oldószer kontrollokból a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának a meghatározásáho; táplálékadag hozzáadása a talajhoz; a férgek tömegének lemérése és a férgek véletlenszerű elosztása a vizsgálati edények között; elegendő féreg-alminta elkülönítése az analitikai háttérértékek, a nedves és száraz tömeg, valamint a lipidtartalom meghatározásához; a vizsgálati edények tömegének lemérése a talaj nedvességtartalmának az ellenőrzése végett; zárt vizsgálati elrendezés használata esetén a levegőellátás ellenőrzése,
1	A levegőellátás ellenőrzése, a férgek viselkedésének és a hőmérsékletnek a dokumentálása; talaj- és féregminták gyűjtése a vizsgált tétel koncentrációjának a meghatározásához,
2	Ugyanaz, mint az 1. napon,
3	A levegőellátás ellenőrzése, a férgek viselkedésének és a hőmérsékletnek a dokumentálása,
4	Ugyanaz, mint az 1. napon,
5–6	Ugyanaz, mint a 3. napon,
7	Ugyanaz, mint az 1. napon; táplálékadag hozzáadása a talajhoz; a vizsgálati edények tömegének ismételt lemérése a talaj nedvességtartalmának ellenőrzésére, és az elpárolgott víz pótlása,
9	Ugyanaz, mint az 1. napon,
10	Ugyanaz, mint a 3. napon,

▼**M4**

Nap	Tennivaló
11	Ugyanaz, mint az 1. napon,
12–13	Ugyanaz, mint a 3. napon,
14	Ugyanaz, mint az 1. napon; táplálékadag hozzáadása a talajhoz; a hőmérséklet és a talaj pH-jának mérése; a vizsgálati edények tömegének ismételt lemérése a talaj nedvességtartalmának ellenőrzésére; a felvételi fázis vége; a férgek áthelyezése a fennmaradó expozíciós edényekből tiszta talajt tartalmazó edényekbe az ürítési fázishoz (béltartalom-ürítés nélkül); talaj- és féregminták gyűjtése az oldószer kontrollokból.
	Az expozíció előtti tennivalókat (ekvilibrációs fázis) a vizsgált vegyi anyag tulajdonságainak a figyelembevételével kell ütemezni.
	A 3. napnál leírt tennivalókat minden nap el kell végezni (legalább munkanapokon).

▼M4

4. függelék

Mesterséges talaj – Az előállításra és a tárolásra vonatkozó ajánlások

Mivel az adott forrásból származó természetes talaj nem biztos, hogy az egész év folyamán rendelkezésre áll, és a talajban élő organizmusok, valamint a mikroszennyező anyagok jelenléte befolyásolhatják a vizsgálatot, ajánlott az e melléklet C.8. fejezetében (Toxicitás földigilisztákra) (48) leírtaknak megfelelően készített mesterséges szubsztrátumot használni ebben a vizsgálatban. Ez a talaj számos faj számára lehetővé teszi a túlélést, a növekedést és a szaporodást, teljes mértékben szabványosított, és rendelkezésre állnak a vizsgálati és tenyésztési körülmények laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti összehasonlításának az adatai.

Talajösszetevők

Tőzeg:	10 %	Az OECD 207. iránymutatása (48) szerinti tőzegmoha,
Kvarchomok:	70 %	Ipari kvarchomok (levegőn szárított); szemcseméret: a részecskék több mint 50 százaléka a 50–200 μm tartományban, de minden részecske mérete ≤ 2 mm,
Kaolinit agyag:	20 %	Kaolinit tartalom ≥ 30 %,
Kalcium-karbonát:	≤ 1 %	Porított, vegytiszta $CaCO_3$.

A mesterséges talaj szerves széntartalma igény szerint csökkenthető, például a tőzegtartalom száraz talaj 4–5 %-ára való csökkentésével és a homoktartalom ennek megfelelő növelésével. A szerves széntartalom csökkentése esetén kisebb a lehetősége a vizsgált vegyi anyag talajon (szerves szénen) való adszorbeálódásának, miközben a vizsgált vegyi anyag hozzáférhetősége a férgek számára javul (74). Kimutatták, hogy az alacsonyabb – például 2,7 % (33), (61), szerves széntartalmú természetes talajokban vizsgált *Enchytraeus albidus* és az *Eisenia fetida* esetében a szaporodással kapcsolatos érvényességi kritériumok teljesülnek, és a tapasztalatok szerint ez az 5 %-os tőzegtartalommal rendelkező mesterséges talajjal is elérhető.

Előállítás

A talaj száraz összetevőit alaposan összekeverjük (például nagyüzemi méretű laboratóriumi keverőgéppel). Ezt körülbelül egy héttel a vizsgálat megkezdése előtt kell megtenni. Az összekevert száraz talajösszetevőket a vizsgált tétellel való szennyezés előtt ionmentesített vízzel legalább 48 órán keresztül nedvesítjük a savasság kiegyensúlyozása/stabilizálása céljából. A pH meghatározásához a talaj és 1 M KCl oldat 1:5 arányú keverékét használjuk. Ha a pH a szükséges tartományon (6,0 ± 0,5) kívül van, akkor megfelelő mennyiségű $CaCO_3$-t kell a talajhoz adni, vagy új adag talajt kell készíteni.

A mesterséges talaj maximális víztartó képességét (WHC) az ISO 11268-2 szabvány (35) szerint kell meghatározni. A vizsgálat megkezdése előtt legalább két nappal a száraz mesterséges talajt annyi ionmentesített víz vagy művíz hozzáadásával nedvesítjük, hogy a végső víztartalom körülbelül felét kapjuk. A végső víztartalom a maximális WHC 40–60 %-a. A vizsgálat kezdetén az előnedvesített talajt annyi adagra osztjuk, ahány vizsgálati koncentrációt és kontrollt használunk a vizsgálathoz, és a vizsgált tétel oldata és/vagy ionmentesített víz vagy művíz hozzáadásával a nedvességtartalmat beállítjuk a WHC_{max} 40–60 %-ának megfelelő szintre. A nedvességtartalmat a vizsgálat kezdetén és végén meg kell határozni (105 °C-on). Az optimális nedvességtartalmat a faj igényei határozzák meg (a nedvességtartalom a következőképpen is ellenőrizhető: ha a talajt a kezünkkel finoman összenyomjuk, kis vízcseppeknek kell megjelenniük az ujjaink között).

▼M4

Tárolás

A mesterséges talaj száraz összetevői a felhasználás időpontjáig szobahőmérsékleten tárolhatók. Az elkészített, előnedvesített talajt a szennyezés előtt legfeljebb három napig lehet hűvös helyen tárolni; gondoskodni kell arról, hogy minél kevesebb víz párologhasson el belőle. A vizsgált tétellel szennyezett talajt azonnal fel kell használni, kivéve, ha olyan információk állnak rendelkezésre, amelyek szerint az adott talaj tárolása nem befolyásolja a vizsgált tétel toxikus hatását és biológiai hozzáférhetőségét. Ebben az esetben a szennyezett talajmintákat az adott vizsgált tétel esetében ajánlott körülmények között lehet tárolni az analízis elvégzéséig.

▼M4

5. függelék

A talajból felvett vizsgált vegyi anyag biológiai felhalmozódásának vizsgálatához ajánlott szárazföldi kevéssertéjű féregfajok

Földigiliszták

A vizsgálathoz ajánlott faj a földigilisztafélék (Lumbricidae) családjába tartozó *Eisenia fetida* (Savigny 1826). 1972 óta két alfajt különböztetünk meg (*Eisenia fetida* és *Eisenia andrei* (10)). Jaenike (36) szerint ezek valódi, külön fajok. Az *Eisenia fetida* könnyen felismerhető a gyűrűin keresztülfutó élénksárga csíkozásáról, míg az *Eisenia andrei* egységes sötétvörös színű. A valószínűleg a Feketetenger vidékéről származó földigiliszták ma már világszerte elterjedtek, különösen az olyan, antropogén tevékenység hatására létrejött élőhelyeken, mint a komposzthalmok. Mindkét földigilisztaféle egyaránt használható ökotoxikológiai és biológiai felhalmozódási vizsgálatokhoz.

Az *Eisenia fetida* és az *Eisenia andrei* kereskedelmi forgalomban beszerezhető, például horgászcsaliként. Más földigilisztafélékkel összehasonlítva életciklusuk rövid, körülbelül 2–3 hónap alatt érik el az ivarérett kort (szobahőmérsékleten). A 20–24 °C körüli hőmérséklet az optimális a számukra. A viszonylag nedves, közel semleges pH-jú, magas szervesanyag-tartalommal rendelkező tenyésztalajokat kedvelik. Mivel ezeket a fajokat immár 25 éve széles körben használják a szabványosított ökotoxikológiai vizsgálatokban, tenyésztésük jól meghatározott (48) (77).

Mindkét faj állati eredetű trágyák széles körében tenyészthető. Az ISO szabványban (35) ajánlott tenyésztőközeg ló- vagy szarvasmarhatrágya és tőzeg fele-fele arányú keveréke. A közegnek 6–7 körüli pH-értékkel (kalcium-karbonáttal szabályozható) és alacsony ionos vezetőképességgel (6 mS/cm-nél alacsonyabb vezetőképességgel vagy 0,5 %-nál alacsonyabb sókoncentrációval) kell rendelkeznie, valamint ammóniával vagy állati vizelettel bőségesen szennyezettnek kell lenni. Használható továbbá kereskedelmi forgalomban beszerezhető, adalékanyagoktól mentes kertészeti célú talaj vagy az OECD iránymutatása (48) szerinti mesterséges talaj, illetve ezek fele-fele arányú keveréke. A szubsztrátumnak nedvesnek kell lennie, de ne legyen túl vizes. A tenyésztéshez 10–50 liter térfogatú tartályok a megfelelők.

Ahhoz, hogy szabványos életkorú és tömegű giliszták álljanak a rendelkezésünkre, a legcélszerűbb gubókból kezdeni a tenyésztést. Tehát a friss szubsztrátumot tartalmazó tenyésztőedényekbe kifejlett férgeket kell helyezni, amelyek lerakják a gubókat. A gyakorlati tapasztalatok szerint körülbelül 100 kifejlett féreg/1 kg szubsztrátum (nedves tömeg) populációsűrűséggel jó szaporodási ütem érhető el. A kifejlett férgeket 28 nap elteltével el kell távolítani. A gubókból kikelő földigilisztákat ivarérett korban, azaz legalább 2, de nem több mint 12 hónap elteltével lehet a vizsgálat céljára felhasználni.

A fent bemutatott fajok egyedei akkor tekinthetők egészségeseknek, ha a szubsztrátumban mozognak, nem próbálják elhagyni azt, és folyamatosan szaporodnak. A nagyon lassú mozgás vagy a farokrész sárga színe (az *Eisenia fetida* esetében) a szubsztrátum kimerülésére utal. Ebben az esetben friss szubsztrátum használata vagy a tartályban lévő állatok számának a csökkentése ajánlott.

Kiegészítő válogatott irodalomjegyzék

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1–58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1–81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49–55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180–201.

▼M4

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1–171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology – from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331–338 pp.

Televényférgek

A vizsgálathoz ajánlott faj az *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (közönséges televényféreg). A gyűrűsférgek (Annelida) törzsébe tartozó televényférgek (Enchytraeidae) családján belül az *Enchytraeus albidus* az egyik legnagyobb méretű faj (akár a 15 mm-t is elérheti), és világszerte elterjedt (például (8)). Az *Enchytraeus albidus* tengeri, édesvízi és szárazföldi élőhelyeken egyaránt megtalálható, főként rothadó szerves anyagban (hínár, komposzt), ritkábban réteken fordul elő (42). Ez a széles ökológiai tolerancia, valamint egyes morfológiai változatok arra utalnak, hogy a fajon belül különböző fajták lehetnek.

Az *Enchytraeus albidus* kereskedelmi forgalomban beszerezhető, haleledelként árulják. Ellenőrizni kell, hogy a tenyészetben ne legyenek más, általában kisebb fajok (60). A tenyészet ilyen szennyeződése esetén az összes férget vízzel át kell mosni egy petri-csészében. Ezt követően ki kell válogatni a kifejlett *Enchytraeus albidus* példányokat (sztereomikroszkóp segítségével), és új tenyészetet kell létesíteni. Az összes többi férget meg kell semmisíteni. A televényférgek életciklusa rövid, 33 nap (18 °C-on), illetve 74 nap (12 °C-on) alatt érik el az ivarérett kort. A vizsgálathoz csak olyan tenyészetet szabad felhasználni, amelyen legalább 5 héten keresztül (egy generáció) semmilyen probléma nem volt megfigyelhető a laboratóriumban.

A célra az *Enchytraeus* nemzetségbe tartozó más fajok is alkalmasak, különösen az *Enchytraeus luxuriosus*. Ez a nemrégiben leírt (65) faj valódi talajlakó. Más televényféreg fajok használata esetén a használt fajt egyértelműen azonosítani, a választást pedig indokolni kell a jegyzőkönyvben.

Az *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992) ugyanabba a fajcsoportba tartozik, mint az *Enchytraeus luxuriosus*. A természetes környezetben való létezése még nem bizonyított, eddig csak földigiliszta-tenyészetekben és komposztban való előfordulásáról számoltak be (Römbke 2003). Eredeti ökológiai igényei tehát nem ismertek. A közelmúltban különféle természetes talajokon végzett laboratóriumi kutatások azonban megerősítették, hogy ez a faj széles körű toleranciát mutat az olyan talajtulajdonságokkal szemben, mint a pH és a textúra (Jänsch et al. 2005). Az elmúlt években gyakran használták ezt a fajt ökotoxikológiai vizsgálatokban, mivel könnyen tenyészthető és vizsgálható (például Kuperman et al. 2003). Kis mérete (3 – 12 mm; átlagosan 7 mm (Westheide & Müller 1996)) miatt azonban nehezebben kezelhető, mint az *Enchytraeus albidus*. Ha az *Enchytraeus albidus* helyett ezt a fajt használjuk, akkor lehet – de nem szükséges – kisebb vizsgálati edényt alkalmazni. Ezenkívül azt is figyelembe kell venni, hogy ez a faj nagyon gyorsan szaporodik, generációs ideje 20 ± 2 °C hőmérsékleten nem éri el a 20 napot (Achazi et al. 1999), magasabb hőmérsékleten pedig még ennél is rövidebb.

Az *Enchytraeus albidus* (és más televényféreg fajok) egyedei mesterséges talaj és kereskedelmi forgalomban beszerezhető, szennyezésmentes, adalékanyagokat nem tartalmazó, kertészeti célú talaj keverékét tartalmazó, nagyméretű műanyag tartályokban tenyészthetők (például 30 × 60 × 10 cm vagy 20 × 12 × 8 cm, amely a kisméretű férgek tenyésztésére alkalmas). A komposzt kerülendő, mivel toxikus vegyi anyagokat, például nehézfémeket tartalmazhat. A tenyésztéshez használt talajból használat előtt háromszor megismételt mélyhűtéssel el kell távolítani a benne élő állatokat. Mesterséges talaj önmagában is használható, de lassúbb szaporodási ütemet eredményezhet, mint a kevert tenyésztalaj. A szubsztrátumnak 6,0 ± 0,5 pH-értékkel kell rendelkeznie. A tenyészetet 15 ± 2 °C hőmérsékleten, fénytől elzártan, inkubátorban kell tartani. A 23 °C fölötti hőmérsékletet feltétlenül kerülni kell. A mesterséges/természetes talajnak nedvesnek kell lennie, de ne legyen túl vizes. Ha a talajt a kezünkkel finoman összenyomjuk, kis vízcseppeknek kell megjelenniük. Az oxigénhiányos körülményeket feltétlenül kerülni kell (például fedél használata esetén elég nagy nyílásoknak kell lenniük rajta ahhoz, hogy a megfelelő levegőcsere biztosított legyen). A tenyésztalajt levegőztetés céljából hetente egyszer óvatosan át kell keverni.

▼M4

A férgeket igény szerint, de hetente legalább egyszer kell etetni zabpehellyel, amelyet a talaj felszínén kialakított mélyedésbe kell helyezni, majd földdel befedni. Ha a legutóbbi etetési időpontban adott táplálék megmarad, a táplálék adagolását megfelelően módosítani kell. Ha a megmaradó táplálékon penészgomba jelenik meg, akkor egy új adag zabpehelyre kell cserélni. A szaporodás serkentése érdekében a zabpehely kéthetente kiegészíthető kereskedelmi forgalomban beszerezhető, vitaminnal dúsított fehérjeporral. Három hónap elteltével az állatokat át kell helyezni egy frissen készített tenyészetbe vagy szubsztrátumba. A zabpelyhet légmentesen zárt edényekben kell tárolni és használat előtt autoklávban kezelni, vagy felmelegíteni a lisztatka (például *Glyzyphagus sp.*, Astigmata, Acarina) vagy ragadozó atka (például *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina) fertőzés elkerülése végett. A fertőtlenítést követően a táplálékot meg kell őrölni, hogy könnyen a talajfelületre szórható legyen. További lehetséges táplálékforrások a sütőélesztő vagy a TetraMin® haleledel.

Általánosságban a tenyésztési körülmények akkor megfelelők, ha a férgek nem próbálják meg elhagyni a szubsztrátumot, gyorsan mozognak a talajban, kültakarójuk fényes, nem tapadnak rá talajszemcsék, többé-kevésbé fehéres árnyalatú, és ha különböző életkorú férgek láthatók. Alapvetően a férgek akkor tekinthetők egészségesnek, ha folyamatosan szaporodnak.

Kiegészítő válogatott irodalomjegyzék

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117–126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51–83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651–656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607–616.

Westheide W and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479–488.

Westheide W and Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263–267.”

▼M6

C.31. SZÁRAZFÖLDI NÖVÉNYEK VIZSGÁLATA: CSÍRÁZÁS ÉS CSÍRANÖVEKEDÉS

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 208. vizsgálati iránymutatásában (2006) leírt módszerrel. A vizsgálati módszereket a tudományos fejlődés és a szabályozási célra történő használatra való alkalmazhatóság alapján rendszeresen felülvizsgálják. E frissített vizsgálati módszer célja, hogy megvizsgálja a vegyi anyagoknak a csírázásra és a csíranövekedésre gyakorolt potenciális hatásait. A vizsgálat nem terjed ki a szaporodásra (azaz a magképzésre, a virág kialakulására, a gyümölcs érésére) gyakorolt krónikus hatásokra. Az expozíció feltételeit és a vizsgálandó vegyi anyag tulajdonságait meg kell fontolni a megfelelő vizsgálati módszerek használatának biztosítása érdekében (például fémek/fémvegyületek vizsgálatakor a pH és a kapcsolódó ellenionok hatásait mérlegelni kell) (1). Ez a vizsgálati módszer nem foglalkozik a vegyi anyagok gőzeinek kitett növényekkel. A vizsgálati módszer általános vegyi anyagok, biocidek és növényvédő szerek (más néven peszticidek) tesztelésére alkalmazható. Meglévő módszerek alapján fejlesztették ki (2) (3) (4) (5) (6) (7). A növények vizsgálatára vonatkozó egyéb hivatkozásokat is figyelembe vettek (8) (9) (10). A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

2. A vizsgálat a vizsgált vegyi anyagnak a magasabb rendű növények csírázására és korai növekedésére gyakorolt hatásait értékeli a talajon (vagy más alkalmas talajmátrixon) keresztül történő expozíciót követően. A magokat érintkezésbe helyezzük a vizsgált vegyi anyaggal kezelt talajjal, és a hatásokat rendszerint 14–21 nap elteltével értékeljük, miután a csíranövények 50 %-a megjelent a kontrollcsoportban. A mért végpontok a csírázás vizuális értékelése, a hajtás száraz tömege (alternatívaként a friss hajtások tömege), és bizonyos esetekben a hajtás magassága, valamint a különböző növényi részeken látható káros hatások értékelése. A méréseket és megfigyeléseket összevetjük a kezeletlen kontroll növényekkel.

3. Az expozíció várható útvonalától függően a vizsgált vegyi anyagot el kell keverni a talajba (vagy esetleg a mesterséges talajmátrixba), vagy szét kell oszlatni a talaj felületén, ami megfelelően képviseli az adott vegyi anyagnak való expozíció potenciális útvonalát. A talajba való elkeverést ömlesztett talaj kezelésével végezhetjük. Az alkalmazást követően a talajt áthelyezzük a cserépbe, majd az adott növényfaj magjait ültetjük a talajba. A felületi alkalmazást a cserepes talajon végezzük, amelybe már beültettük a magokat. A vizsgálati egységeket (kontroll és kezelt talaj plusz magok) ezután megfelelő, a növények csírázását/növekedését támogató körülmények közé helyezzük.

4. A vizsgálatot a vizsgálat célja szerint el lehet végezni a dózis-válasz görbe meghatározása érdekében, vagy pedig egyetlen koncentráció/arány alkalmazásával határérték vizsgálatként. Ha az egyetlen koncentráció/arány vizsgálatának eredményei meghaladnak egy bizonyos toxicitási szintet (például hogy x %-nál nagyobb mértékű hatás figyelhető-e meg), akkor dózisbehatároló vizsgálatot kell végezni a toxicitás felső és alsó határértékeinek meghatározása céljából, amelyet egy több koncentrációban/arányban elvégzett vizsgálatnak kell követnie a dózis-válasz görbe felvétele céljából. Megfelelő statisztikai elemzést kell használni az érdeklődésre számot tartó legérzékenyebb paraméter(ek) EC_x hatékony koncentrációjának vagy ER_X hatékony alkalmazási arányának (pl. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) megállapításához. Továbbá, az észlelhető hatást még nem okozó koncentrációt (NOEC) és az észlelhető hatást okozó legkisebb koncentrációt (LOEC) is ki lehet számítani ebben a vizsgálatban.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

5. Az alábbi információ hasznos a vegyi anyag várható expozícós útvonalának azonosításához és a vizsgálat tervezéséhez: szerkezeti képlet, tisztaság, vízben

▼M6

való oldhatóság, szerves oldószerekben való oldhatóság, 1-oktanol-víz megoszlási hányados, talaj szorpciós viselkedés, gőznyomás, kémiai stabilitás vízben és fényben, illetve biológiai lebonthatóság.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

6. A vizsgálat érvényességéhez az alábbi teljesítménykritériumoknak kell teljesülniük a kontrollcsoport(ok)ban:

— a magoknak legalább 70 %-a kicsírázott;

— a csíranövények nem mutatják fitotoxikus hatások látható jeleit (pl. klorózis, elhalás, hervadás, levél- és szárdeformációk) és a növények csak az adott fajnál szokásos növekedési és morfológiái változatosságot mutatják;

— az átlagos túlélési arány a kikelt kontroll-csíranövények esetében legalább 90 % a vizsgálat időtartama alatt;

— egy adott faj környezeti feltételei megegyeznek és a táptalaj ugyanakkora mennyiségű talajmátrixot, támogató közeget vagy ugyanabból a forrásból származó táptalajt tartalmaz.

REFERENCIA-VEGYIANYAG

7. A referencia-vegyianyagot rendszeres időközönként ellenőrizni lehet annak igazolása céljából, hogy a vizsgálat elvégzése, az adott kísérleti növények által adott válasz és a vizsgálati feltételek nem változtak jelentősen az idő múlásával. Alternatív megoldásként a kontrollok élőanyagtömegének vagy növekedésének korábbi mérési eredményeit lehet felhasználni a vizsgálati rendszer adott laboratóriumban történő értékelésére, amely a laboratóriumon belüli minőségellenőrzési intézkedésként szolgálhat.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Természetes talaj – Mesterséges táptalaj

8. A növényeket cserépben lehet nevelni homokos vályog, agyagos homok, vagy homokos agyagos vályog használatával, amely legfeljebb 1,5 százalék szerves szént tartalmaz (kb. 3 százalék szerves anyag). A legfeljebb 1,5 százalék szerves szént tartalmazó kereskedelmi virágföldek vagy szintetikus talajkeverékek is használhatók. Agyagos talajok nem használhatók, ha a vizsgált vegyi anyagról közismert, hogy nagy az agyaghoz való affinitása. A terepről származó talajt a homogenizálás és a durva részecskék eltávolítása érdekében 2 mm lyukátmérőjű szitán meg kell szitálni. A végső előkészített talaj típusát és textúráját, százalékos szerves szén tartalmát, pH-ját, sótartalmát és elektronikus vezetőképességét meg kell adni a jelentésben. A talajt be kell sorolni a standard osztályozási rendszer szerint (11). A talajt pasztőrözni vagy hőkezelni lehet a talajkórokozók hatásának csökkentése érdekében.

9. A természetes talaj az eltérő fizikai/kémiai tulajdonságok és mikrobiális populációk miatt megnehezítheti az eredmények értelmezését és növelheti a változékonyságot. Ezek a változók megváltoztatják a nedvességmegtartó képességet, a kémiai megkötő képességet, az átszellőzést, valamint a tápanyag- és nyomelemtartalmat. E fizikai tényezők változékonysága mellett a kémiai tulajdonságok – például a pH és a redox potenciál – is változékonyak lehetnek, ami hatással lehet a vizsgált vegyi anyag biológiai hozzáférhetőségére (12) (13) (14).

10. A mesterséges táptalajokat jellemzően nem használják a növényvédő szerek vizsgálatánál, de hasznosak lehetnek az általános vegyi anyagok vizsgálatának céljára, vagy ha arra van szükség, hogy minimálisra csökkentsük a természetes talajok variabilitását és jobban összehasonlíthatóak legyenek a vizsgálati eredmények. A táptalajoknak inert anyagokból kell állniuk, amelyek minimalizálják a vizsgált vegyi anyaggal, az oldószer hordozóanyaggal, vagy mindkettővel való kölcsönhatást. A savval mosott kvarchomokot, az ásványgyapotot és az üveggyöngyöket (pl. a 0,35-0,85 mm átmérőjű gyöngyöket) alkalmas inert anyagoknak találták, amelyek minimális

▼M6

mértékben nyelik el a vizsgált vegyi anyagot (15), és biztosítják, hogy a csíranövények a vegyi anyagot a gyökereiken keresztül maximális mértékben fel tudják venni. Az alkalmatlan táptalajok közé tartoznak a vermikulit, a perlit és az egyéb erősen nedvszívó anyagok. A növények számára tápanyagokat kell biztosítani annak érdekében, hogy a növényekre ne gyakoroljon stresszhatást a tápanyaghiány, és ahol lehetséges, ezt kémiai elemzés vagy a kontroll növények vizuális értékelése útján ellenőrizni kell.

A vizsgált fajok kiválasztásának kritériumai

11. A kiválasztott fajoknak meglehetősen széleskörűnek kell lenniük, pl. a növényvilágon belüli rendszertani diverzitás, az elterjedtség, az előfordulási gyakoriság, az életciklus fajspecifikus jellemzői és a természetbeli előfordulás földrajzi területe tekintetében, hogy széles választartományt adjanak (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). A lehetséges vizsgálati fajok következő jellemzőit kell figyelembe venni a kiválasztás során:

— a fajoknak egységes méretű magokkal kell rendelkezniük, amelyek a megbízható standard vetőmag forrás(ok)ból könnyen hozzáférhetőek, és konzisztens, megbízható és egyenletes csírázást, valamint a csíranövény egyenletes növekedését mutatják;

— a növények alkalmasak a laboratóriumban végzett vizsgálatok céljára, illetve megbízható és reprodukálható eredményeket adnak a vizsgálati létesítményen belül és azok között;

— a vizsgált fajok érzékenységének összhangban kell lennie a vegyi anyagnak kitett környezetben található növények által adott válaszokkal;

— a fajokat bizonyos mértékig már használták korábbi toxicitási vizsgálatok során, és az alkalmazásuk során szerzett tapasztalatok – például gyomirtó biológiai vizsgálatokban, nehézfém szűrővizsgálatokban, sótartalommal kapcsolatos vagy ásványi stressz vizsgálatokban, illetve allelopátia vizsgálatokban – azt mutatják, hogy sokféle stresszorral szemben mutatnak érzékenységet;

— összhangban vannak a vizsgálati módszer növekedési feltételeivel;

— megfelelnek a vizsgálat érvényességi követelményeinek.

Néhány korábban gyakran használt fajt a 2. függelék sorol fel, a potenciális nem terményfajok pedig a 3. függelékben találhatók.

12. A vizsgálandó fajok száma függ a vonatkozó jogszabályi követelményektől, ezért ezt a vizsgálati módszer nem határozza meg.

A vizsgált vegyi anyag bevitele

13. A vegyi anyagot egy megfelelő hordozóban (pl. víz, aceton, etanol, polietilén-glikol, gumiarábikum, homok) kell bevinni. Hatóanyagokat és különböző segédanyagokat tartalmazó keverékeket (formulázott termékeket vagy készítményeket) is lehet vizsgálni.

Bevitel a talajba/mesterséges táptalajba

14. A vízben oldható vagy vízben szuszpendált vegyi anyagokat vízhez adjuk, majd az oldatot egy megfelelő keverőberendezés segítségével összekeverjük a talajjal. Ez a fajta vizsgálat akkor lehet megfelelő, ha a vegyi anyagnak való kitettség a talajon vagy a talaj pórusaiban lévő vízen keresztül történik, és felmerül a gyökereken át történő felvétel lehetősége. A talaj vízmegtartó képességét a vizsgált vegyi anyag hozzáadásával nem szabad túllépni. A hozzáadott víz térfogatának meg kell egyeznie minden egyes kísérleti koncentráció esetében, de annak mértékét korlátozni kell, hogy a talaj agglomerátumok csomósodása megakadályozható legyen.

▼M6

15. A vízben kevésbé oldódó vegyi anyagokat egy alkalmas illékony oldószerben (pl. aceton, etanol) fel kell oldani, és homokkal el kell keverni. Az oldószert ezután légáram használatával, a homok állandó kevergetése közben eltávolítjuk a homokból. A kezelt homokot összekeverjük a kísérleti talajjal. Létre kell hozni egy második kontroll mintát is, amely csak homokot és oldószert kap. Egyenlő mennyiségű homokot – a bekevert és eltávolított oldószerrel – kell adni minden kezelési szinthez és a második kontrollhoz. Szilárd, oldhatatlan vizsgált vegyi anyagok esetében a vegyi anyagot egy alkalmas keverő berendezés segítségével összekeverjük száraz talajjal. A továbbiakban a talajt hozzáadjuk a cserepekhez, és azonnal magokat vetünk bele.

16. Amikor talaj helyett mesterséges táptalajt használunk, a vízben oldható vegyi anyagokat közvetlenül a vizsgálat megkezdése előtt oldjuk fel a tápoldatban. A vízben oldhatatlan, de vízben oldószer hordozó segítségével szuszpendálható vegyi anyagokat a hordozóanyaggal együtt kell hozzáadni a tápoldathoz. A vízben nem oldódó vegyi anyagokat, amelyek esetében nem áll rendelkezésre nem-toxikus vízoldékony hordozó, egy megfelelő illékony oldószerben kell feloldani. Az oldatot összekeverjük homokkal vagy üveggyöngyökkel, behelyezzük egy forgó vákuum berendezésbe és elpárologtatjuk, így a vegyi anyag egyenletes bevonatot fog képezni a homokon vagy a gyöngyökön. A cserepek feltöltése előtt a gyöngyök egy lemért részét ugyanazzal a szerves oldószerrel extrahálni, majd a vegyi anyagra analizálni kell.

Felületi alkalmazás

17. Növényvédő termékek esetében a vizsgált vegyi anyag bevitelére gyakran alkalmazzák a talaj felületének a vizsgálati oldattal való permetezését. A vizsgálatok során használt berendezéseknek, beleértve a vizsgált vegyi anyag elkészítésére és bevitelére használt berendezéseket, olyan elrendezésűnek és kapacitásúnak kell lenniük, hogy a berendezéseket használó vizsgálatokat a legpontosabb módon lehessen elvégezni és reprodukálható lefedettséget adjanak. A lefedettség egyenletes legyen a talaj egész felületén. Ügyelni kell arra, hogy elkerüljék annak lehetőségét, hogy a vegyi anyagokat a berendezések adszorbeálják vagy azokkal reakcióba lépjenek (pl. műanyag csövek és lipofil vegyi anyagok, vagy acél alkatrészek és elemek). A vizsgált vegyi anyagot rápermetezzük a talaj felületére, utánozva a permetezőtartályból történő tipikus alkalmazást. A permettérfogatoknak általában a normál mezőgazdasági gyakorlatnak megfelelő tartományban kell lenniük, és a térfogatokat (víz mennyisége stb.) meg kell adni a jegyzőkönyvben. Olyan fűvókatípust kell kiválasztani, amely egyenletes lefedettséget biztosít a talaj felszínén. Ha oldószereket és hordozókat alkalmazunk, egy kontroll növényekből álló második csoportot is ki kell alakítani, amely kizárólag oldószert/hordozóanyagot kap. Ez nem szükséges készítményként vizsgált növényvédelmi termékek esetében.

A vizsgált vegyi anyag koncentrációjának/arányának ellenőrzése

18. A koncentrációkat vagy az alkalmazás mértékét megfelelő analitikai ellenőrzéssel meg kell erősíteni. Oldható vegyi anyagok esetében valamennyi koncentráció/arány ellenőrzése megerősíthető a vizsgálat során alkalmazott legmagasabb koncentrációjú vizsgálati oldat elemzése révén a rákövetkező hígításra vonatkozó dokumentációval és kalibrált beviteli berendezésekkel (pl. kalibrált analitikai üvegáru, permetező berendezések kalibrálása). Oldhatatlan vegyi anyagok esetében az összetett anyag ellenőrzését a vizsgált vegyi anyagnak a talajhoz adott tömegével kell biztosítani. Ha demonstrálni kell a homogenitást, a talaj elemzésére lehet szükség.

AZ ELJÁRÁS

A vizsgálat megtervezése

19. Azonos fajba tartozó magokat ültetünk el cserepekben. A cserepenként elültetett magok száma a fajtól, a cserép méretétől és a vizsgálat időtartamától függ. A edényenkénti növények számának megfelelő növekedési feltételeket kell biztosítania, és el kell kerülni túlzsúfoltságot a vizsgálat időtartama alatt.

▼M6

A maximális tőszám 3–10 mag/100 cm^2 körül van a magok méretétől függően. Például 1–2 kukorica, szójabab, paradicsom, uborka, vagy cukorrépa növény ajánlott egy 15 cm-es tartályban; három repce vagy hüvelyes növény ajánlott egy 15 cm-es tartályban; és 5–10 hagyma, búza, vagy más apró mag ajánlott egy 15 cm-es tartályban. A magok és az ismétlések száma (az ismétlés edényként van meghatározva, ezért az azonos edényben található növények nem jelentenek ismétlést) elegendő kell legyen az optimális statisztikai elemzéshez (21). Meg kell jegyezni, hogy a változékonyság nagyobb lesz az olyan vizsgált fajok esetében, ahol kevesebb nagy magot használunk edényenként (ismétlésenként), összehasonlítva azokkal a vizsgált fajokkal, ahol nagyobb számú kis magot lehet használni edényenként. Edényenként azonos számú mag ültetésével ez a változékonyság minimalizálható.

20. Kontrollcsoportokat kell használni annak igazolására, hogy a megfigyelt hatások összefüggenek a vizsgált vegyi anyagnak való kitettséggel, illetve kizárólag annak tulajdoníthatók. A megfelelő kontrollcsoportnak minden tekintetben azonosnak kell lennie a vizsgált csoporttal, kivéve a vizsgált vegyi anyagnak való kitettséget. Egy adott vizsgálaton belül valamennyi kísérleti növénynek, beleértve a kontrollokat is, azonos forrásból kell származnia. A torzítások megelőzése érdekében a vizsgálati és kontroll edények véletlen besorolására van szükség.

21. Az inszekticiddel vagy fungiciddel bevont magokat (azaz a „kikészített” magokat) kerülni kell. Bizonyos nem szisztémás kontakt fungicidek (pl. kaptán, thiram) használatát azonban egyes szabályozó hatóságok engedélyezik (22). Ha a magok által hordozott kórokozók jelenléte aggodalomra adhat okot, a magokat rövid ideig gyenge 5 %-os hipoklorit-oldatba lehet mártani, majd alaposan át kell öblíteni folyó vízzel és meg kell szárítani. Az egyéb növényvédőszerekkel végzett javító kezelés nem engedélyezett.

Vizsgálati körülmények

22. A vizsgálati feltételeknek meg kell közelíteniük a vizsgált fajok és fajták normális növekedéséhez szükséges feltételeket (a vizsgálati feltételek példáit lásd a 4. függelékben). A fejlődő növényeket a jó kertészeti gyakorlatnak megfelelően ellenőrzött környezetű kamarákban, fitotronokban, vagy üvegházakban kell tartani. Növesztő létesítmények használata esetén ez a gyakorlat rendszerint magában foglalja a hőmérséklet, a páratartalom, a szén-dioxid-koncentráció, a fény (fényerő, hullámhossz, fotoszintetikusan aktív sugárzás) és a megvilágítási időszak, az öntözőeszközök, stb. ellenőrzését és megfelelően rendszeres (pl. naponta történő) feljegyzését a növények megfelelő fejlődésének biztosítása érdekében, amelyet a kiválasztott fajba tartozó kontroll növények alapján ítélnek meg. Az üvegházi hőmérsékletet a szellőztetés és a fűtő és/vagy hűtő rendszerek segítségével kell kontrollálni. Üvegházban történő vizsgálat esetén általában az alábbi feltételek ajánlottak:

— hőmérséklet: 22 °C ± 10 °C;

— nedvesség: 70 % ± 25 %;

— megvilágítási időszak: minimum 16 óra fény;

— fényerő: 350 ± 50 μE/m2/s. A kevesebb fényt igénylő fajok kivételével 400-700 nm hullámhosszú kiegészítő világításra lehet szükség, ha a fényerő 200 μE/m2/s alá csökken.

A környezeti feltételeket a vizsgálat során nyomon kell követni és jegyzőkönyvezni kell. A növényeket nem porózus műanyag vagy mázas edényekben kell nevelni, az edény alatt elhelyezett tálcával vagy csészealjjal.

▼M6

Az edényeket rendszeresen át lehet helyezni a vizsgálati feltételek tekintetében a növesztő létesítményen belül fennálló különbségek miatt kialakuló és a növények növekedésében megmutatkozó variabilitás minimalizálása érdekében. Az edényeknek elég nagynak kell lenniük ahhoz, hogy lehetővé tegyék a normális növekedést.

23. A talajt tápanyagokkal lehet egészíteni, hogy fenntartsuk a növények jó életképességét. A kiegészítő tápanyagok iránti igényt és azok időzítését a kontroll növények megfigyelése alapján lehet megítélni. Ajánlott a vizsgálati edények alsó öntözése (pl. üvegszálból készült kanóc használatával). Kezdetben azonban felső öntözést is lehet használni a magok csírázásának ösztönzése céljából, illetve a talaj felületén történő kezelés esetén, mivel megkönnyíti a vegyi anyag bejutását a talajba.

24. A specifikus növekedési feltételeknek megfelelőnek kell lenniük a vizsgált faj és a vizsgált vegyi anyag számára. A kontroll és a kezelt növényeket azonos környezeti feltételek között kell tartani, megfelelő intézkedéseket kell azonban tenni a vizsgált vegyi anyaggal történő keresztexpozíció (pl. illékony vegyi anyagok) megakadályozására a különböző kezelési csoportok között, illetve a kezelési csoportok és a kontrollok között.

Egyetlen koncentrációban/arányban történő vizsgálat

25. Egy vegyi anyag egyetlen koncentrációval vagy aránnyal történő vizsgálatának lefolytatásához megfelelő koncentráció/arány (kihívás/határérték) meghatározása érdekében számos tényezőt kell figyelembe venni. Általános vegyi anyagok esetében ezek közé tartoznak a vegyi anyag fizikai/kémiai tulajdonságai. Növényvédő szerek esetében a vizsgált vegyi anyag fizikai/kémiai tulajdonságait és felhasználási formáit, maximális koncentrációját vagy kiszórt mennyiségét, a szezononkénti alkalmazások számát és/vagy a vizsgált vegyi anyag perzisztenciáját figyelembe kell venni. Annak meghatározására, hogy egy általános vegyi anyag rendelkezik-e fitotoxikus tulajdonságokkal, a vegyi anyagot legfeljebb 1 000 mg/kg száraz talaj szinten kell vizsgálni.

Dózisbehatároló vizsgálat

26. Ha szükséges, dózisbehatároló vizsgálatot lehet végezni, hogy útmutatást nyújtson arra vonatkozóan, milyen koncentrációkat/arányokat kell vizsgálni a meghatározó dózis-válasz vizsgálatban. A dózisbehatároló vizsgálathoz a vizsgálati koncentrációknak/arányoknak nagy léptékkel kell emelkedniük (pl. 0,1, 1,0, 10, 100 és 1 000 mg/kg száraz talaj). A növényvédő szerek esetében a koncentrációknak/arányoknak az ajánlott vagy maximális koncentráción, illetve kiszórt mennyiségen kell alapulniuk, pl. az ajánlott/maximális koncentráció vagy a kiszórt mennyiség 1/100, 1/10, 1/1 része.

Több koncentrációban/arányban történő vizsgálat

27. A több koncentrációban/arányban történő vizsgálat célja a dózis-válasz összefüggés megállapítása és a csírázás EC_x vagy ER_X értékének, illetve az élőanyagtömegnek és/vagy a látható hatásoknak a nem kitett kontrollokhoz viszonyított meghatározása, a szabályozó hatóságok követelményei szerint.

28. A koncentrációk és arányok számának és elhelyezkedésének elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy megbízható dózis-válasz összefüggést és regressziós egyenletet generáljanak, és becslést adjanak az EC_x vagy az ER_x értékére. A kiválasztott koncentrációknak/arányoknak körbe kell venniük a meghatározandó EC_x vagy ER_x értéket. Például, ha az EC_{50} értékre van szükség, akkor olyan arányokat kell vizsgálni, amelyek 20–80 %-os hatást eredményeznek. Az ennek eléréséhez ajánlott kísérleti koncentrációk/arányok száma legalább öt egy mértani sorozatban, plusz a kezeletlen kontroll, és az egyes

▼M6

koncentrációkat/arányokat egymástól elválasztó kvóciens értéke legfeljebb három lehet. Minden egyes kezelt és kontroll csoport esetében az ismétlések száma legalább négy legyen, a magok számának pedig legalább 20-nak kell lennie. Az alacsony csírázási arányú vagy változó növekedésű növények esetében több ismétlésre lehet szükség a vizsgálat statisztikai erejének növelése érdekében. Ha nagyobb számú kísérleti koncentrációt/arányt használnak, az ismétlések száma csökkenthető. Ha a NOEC értékét kívánják becsülni, több ismétlésre lehet szükség a kívánt statisztikai erő eléréséhez (23).

Megfigyelések

29. A megfigyelési időszak alatt, azaz a kontroll növények (adott esetben az oldószer kontrollok is) 50 %-ának kicsírázása után 14-21 napig a növényeket gyakran megfigyelik (legalább hetente, vagy ha lehetséges, naponta), hogy ellenőrizzék a csírázást, a látható fitotoxicitást és a mortalitást. A vizsgálat végén fel kell jegyezni a túlélő növények csírázási százalékát és élőanyagtömegét, valamint a növény különböző részein látható káros hatásokat. Utóbbiak közé tartoznak a csíranövények megjelenésében mutatkozó rendellenességek, a fejlődésben való visszamaradás, a klorózis, az elszíneződés, a mortalitás, és a növény fejlődésére gyakorolt hatások. A végső élőanyagtömeget a túlélő növények hajtásainak átlagos száraz tömege segítségével lehet mérni, amelyhez a hajtásokat a talaj felszínén kell levágni és 60 °C-on tömegállandóságig szárítani. Alternatív módszerként a végső élőanyagtömeget a hajtások friss tömegének segítségével is mérni lehet. A hajtások magassága egy másik végpont lehet, ha a szabályozó hatóságok megkövetelik. A látható sérülések tekintetében egységes pontozási rendszert kell használni a megfigyelhető toxikus válaszok értékelésére. A minőségi és mennyiségi vizuális értékelés elvégzésére vonatkozó példák a (23) és (24) szakirodalmi hivatkozásban találhatók.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Statisztikai elemzés

Egyetlen koncentráció/arány vizsgálata

30. Az egyes növényfajok adatait megfelelő statisztikai módszerrel kell elemezni (21). A vizsgált koncentráció/arány hatásának szintjét, vagy az adott hatás elérésének hiányát a vizsgált koncentrációban/arányban (pl. <x % hatást figyeltek meg y koncentráció vagy arány esetén) jegyzőkönyvezni kell.

Több koncentráció/arány vizsgálata

31. A dózis-válasz kapcsolatot egy regressziós egyenlet formájában állapítják meg. Különböző modellek használhatók: például a csírázás EC_x vagy ER_x értéke (pl. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) és a megbízhatósági határok – mint kvantális adatok – becslésére a logit, probit, Weibull, Spearman-Karber, vágott Spearman-Karber módszerek, stb. lehetnek megfelelőek. A csíranövények növekedése (tömeg és a magasság), mint folyamatos végpont esetében az EC_x vagy ER_x értéket és a megbízhatósági határokat megfelelő regressziós elemzés (pl. Bruce-Versteeg nem lineáris regressziós elemzés (25)) segítségével lehet megbecsülni. Ahol csak lehetséges, a legérzékenyebb fajok esetében az R^2 legyen 0,7 vagy magasabb, és az alkalmazott vizsgálati koncentrációknak/arányoknak a 20–80 %-os hatások tartományát kell felölelniük. Ha a NOEC értékét kívánják becsülni, az erős statisztikai vizsgálatok alkalmazását kell előnyben részesíteni, és ezeket az adatok eloszlása alapján kell kiválasztani (21) (26).

Vizsgálati jegyzőkönyv

32. A vizsgálati jegyzőkönyvnek be kell mutatnia a vizsgálatok eredményeit, valamint a vizsgálati feltételek részletes leírását, az eredmények alapos megvitatását, az adatok elemzését, és az abból levont következtetéseket. Egy táblázatos összefoglalót és az eredmények kivonatát is el kell készíteni. A jelentés kötelező elemei a következők:

▼**M6**

Vizsgált vegyi anyag:

— kémiai azonosító adatok, a vizsgált vegyi anyag lényeges tulajdonságai (pl. log P_{ow}, vízoldhatóság, gőznyomás, illetve a környezetben bekövetkező sorsra és viselkedésre vonatkozó információk, ha rendelkezésre állnak);

— a vizsgálati oldat elkészítésére és a vizsgált koncentrációk ellenőrzésére vonatkozó információk a 18. pontban meghatározottak szerint.

A vizsgálathoz felhasznált faj:

— a vizsgált szervezetre vonatkozó információk: faj/fajta, növénycsalád, tudományos és közönséges név, a mag eredete és története a lehető legrészletesebben (azaz a szállító neve, csírázási százalék, mag méretkategória, tételszám, gyűjtés éve vagy vegetációs időszaka, csírázási minősítés dátuma), életképesség, stb.;

— a vizsgált egy- és kétszikű fajok száma;

— a faj kiválasztásának indoklása;

— a mag tárolásának, kezelésének és fenntartásának leírása.

Vizsgálati körülmények:

— vizsgálati berendezés (pl. növesztőkamra, fitotron és üvegház);

— a vizsgálati rendszer leírása (pl. edényméretek, az edény anyaga és a talaj mennyisége);

— a talaj jellemzői (textúra vagy a talaj típusa: a talaj részecskeeloszlása és osztályozása, fizikai és kémiai tulajdonságai, beleértve a szerves anyagok százalékos arányát, a szerves szén százalékos arányát és a pH-t);

— a talaj/táptalaj (pl. talaj, mesterséges talaj, homok és egyéb) előkészítése a vizsgálat előtt;

— a tápközeg leírása, ha használnak ilyet;

— a vizsgált vegyi anyag alkalmazása: a felhasználás módjának leírása, a berendezés leírása, az expozíciós arányok és mennyiségek, beleértve a vegyi anyag ellenőrzését, a kalibrációs módszer leírása és az alkalmazása során tapasztalt környezeti feltételek leírása;

— növekedési feltételek: fényerő (pl. PAR: fotoszintetikusan aktív sugárzás), megvilágítási időszak, maximum és minimum hőmérséklet, az öntözés ütemezése és módja, trágyázás;

— a magok száma edényenként, a növények száma dózisonként, az ismétlések (edények) száma expozíciós arányonként;

— a kontrollok típusa és száma (negatív és/vagy pozitív kontrollok, oldószer kontroll, ha van);

— a vizsgálat időtartama.

Eredmények:

— az összes végpontot, a vizsgálati koncentrációt/arányt és fajt tartalmazó táblázat minden ismétlés esetében;

— a csírázó növények száma és százalékos aránya a kontrollcsoporthoz viszonyítva;

— a növények élőanyagtömegének mérési eredményei (a hajtások száraz tömege vagy nedves tömege) a kontrollok százalékában;

▼M6

— a növényi hajtások magassága a kontrollok százalékában, ha mérik;

— a vizsgált vegyi anyag által okozott látható sérülések százalékos aránya és a látható sérülések kvalitatív és kvantitatív leírása (klorózis, nekrózis, hervadás, levél- és szárdeformáció, valamint a hatások hiánya), a kontroll növényekkel összehasonlítva;

— a látható sérülések megítéléséhez használt értékelő rendszer leírása, ha készült vizuális értékelés;

— egy arányt tartalmazó vizsgálatok esetében a károsodás százalékos arányát kell jegyzőkönyvezni;

— az EC_x vagy ER_x (pl. EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) értékek és a kapcsolódó megbízhatósági határok. Ha regressziós elemzést végeznek, biztosítani kell a standard hibát a regressziós egyenlethez, valamint a standard hibát az egyéni paraméterek becsléséhez (pl. emelkedés, metszés);

— a NOEC (és LOEC) érték, ha kiszámították;

— a statisztikai eljárások és feltételezések leírása;

— ezen adatok és a vizsgált faj dózis-válasz összefüggésének grafikus bemutatása.

Az e vizsgálati módszerben leírt eljárásoktól való eltérések és a vizsgálat során bekövetkezett valamennyi szokatlan esemény.

IRODALOM

(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) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet. (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) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet. (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) E melléklet C.33. fejezete: Földigiliszták szaporodásának vizsgálata (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*).

▼M6

1. függelék

Fogalommeghatározások

Hatóanyag (a.i.), (vagy aktív anyag (a.s.)): egy specifikus biológiai hatás (pl. rovarirtás, növénybetegségek elleni védekezés, gyomirtás a kezelt területen) elérése céljából tervezett anyag, más néven technikai minőségű hatóanyag, aktív anyag.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Növényvédő szerek (CPP vagy PPP) vagy peszticidek: adott biológiai aktivitással rendelkező anyagok, amelyeket szándékosan használnak a termés kártevőktől (pl. gombás betegségek, rovarok és versengő növények) való megóvása érdekében.

EC_x, x %-os hatáskoncentráció vagy ER_x, x %-os hatásarány: az a koncentráció vagy arány, amely x %-os nemkívánatos változást vagy módosulást eredményez a vizsgált végpontban a kontrollhoz viszonyítva (pl. a csírázás, a hajtástömeg, vagy a megmaradó növények végső számának 25 %-os vagy 50 %-os csökkenése, illetve a látható károsodás 25 %-os vagy 50 %-os növekedése EC_{25}/ER_{25}-nek vagy EC_{50}/ER_{50}-nek minősül).

Csírázás: a koleoptil vagy a sziklevél megjelenése a talaj felülete felett.

Készítmény: a kereskedelemben kapható formulázott termék, amely az aktív anyagot (hatóanyagot) tartalmazza, más néven végső készítmény ([1]) vagy tipikus végfelhasználói termék (typical end-use product, TEP).

LOEC (észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon legalacsonyabb koncentrációja, amelynek alkalmazása esetén hatás volt megfigyelhető. Ebben a vizsgálatban a LOEC-nek megfelelő koncentrációnak nincs statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$) az adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva, és magasabb, mint a NOEC-érték.

Nem célzott növények: Azok a növények, amelyek kívül esnek a célnövény területén. A növényvédő szerek esetében ez általában a kezelt területen kívüli növényeket jelenti.

NOEC (észlelhető hatást még nem okozó koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon legmagasabb koncentrációja, amelyen hatás nem volt megfigyelhető. Ebben a vizsgálatban a NOEC-nek megfelelő koncentrációnak nincs statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$) az adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva.

Fitotoxicitás: A növények normális megjelenési mintájától és növekedésétől egy adott vegyi anyag hatására kialakuló káros eltérések (méréses és vizuális értékelés alapján).

Ismétlés: az a vizsgálati egység, amely megtestesíti a kontrollcsoportot és/vagy a kezelési csoportot. Ezekben a vizsgálatokban az edényt definiálják ismétlésként.

Vizuális értékelés: A látható károsodás értékelése a növény állásának, életerejének, fejlődési rendellenességeinek, klorózisának, nekrózisának, és általános megjelenésének megfigyelése alapján, a kontrollal összehasonlítva.

Vizsgált vegyi anyag: Az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

([1]) Végső készítmény: Az aktív vegyi anyagot (hatóanyagot) tartalmazó, a kereskedelemben értékesített formulázott termék.

▼**M6**

2. függelék

A növények vizsgálata során történelmileg használt fajok jegyzéke

Család	Faj	Közismert név
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	*Daucus carota*	Sárgarépa
Asteraceae (Compositae)	*Helianthus annuus*	Napraforgó
Asteraceae (Compositae)	*Lactuca sativa*	Saláta
Brassicaceae (Cruciferae)	*Sinapis alba*	Fehér mustár
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica campestris* var. *chinensis*	Kínai kel
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica napus*	Olajrepce
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica oleracea* var. *capitata*	Káposzta
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica rapa*	Tarlórépa
Brassicaceae (Cruciferae)	*Lepidium sativum*	Kerti zsázsa
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus*	Retek
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	Cukorrépa
Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	Uborka
Fabaceae (Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	Szójabab
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	Mungóbab
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	Törpe bab, zöldbab, kerti bab
Fabaceae (Leguminosae)	*Pisum sativum*	Borsó
Fabaceae (Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	Görögszéna
Fabaceae (Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	Szarvaskerep
Fabaceae (Leguminosae)	*Trifolium pratense*	Vöröshere
Fabaceae (Leguminosae)	*Vicia sativa*	Bükköny
Linaceae	*Linum usitatissimum*	Len
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum*	Hajdina
Solanaceae	*Solanum lycopersicon*	Paradicsom

▼**M6**

Család	Faj	Közismert név
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amaryllada-ceae)	*Allium cepa*	Vöröshagyma
Poaceae (Gramineae)	*Avena sativa*	Zab
Poaceae (Gramineae)	*Hordeum vulgare*	Árpa
Poaceae (Gramineae)	*Lolium perenne*	Évelő perje
Poaceae (Gramineae)	*Oryza sativa*	Rizs
Poaceae (Gramineae)	*Secale cereale*	Rozs
Poaceae (Gramineae)	*Sorghum bicolor*	Cirokmag, shattercane
Poaceae (Gramineae)	*Triticum aestivum*	Búza
Poaceae (Gramineae)	*Zea mays*	Kukorica

▼M6

3. függelék

A lehetséges nem terményfajok jegyzéke

OECD potenciális fajok növényi toxicitás vizsgálatára.*Megjegyzés:* Az alábbi táblázat 52 nem terményfajról tartalmaz információt (az egyes tételekhez kapcsolódó hivatkozások zárójelben vannak megadva). A megadott csírázási arányok a publikált szakirodalomból származnak és csak általános útmutatóként szolgálnak. Az egyéni tapasztalatok a mag beszerzési forrásától és egyéb tényezőktől függően változhatnak.

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam ([1]) és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka ([2])	Ültetési mélység (mm) ([3])	Csírázási idő (nap) ([4])	Különleges kezelések ([5])	Toxicitási vizsgálat ([6])	Mag beszerzési források ([7])	Egyéb hivatkozások ([8])
APIACEAE *Torilis japónica* (bojtorjános tüskemag)	A, B bolygatott területek, sövények, legelők (16, 19)	1,7–1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	hideg sztratifikáció (7, 14, 18, 19) érlelésre lehet szükség (19) csírázást a sötétség gátolja (1, 19) különleges kezelést nem igényel (5)	POST (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (angol százszorszép)	P rétek, szántók, gyepek (16, 19)	0,09–0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (18, 19) különleges kezelést nem igényel (4, 14)	POST (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (búzavirág)	A mezők, utak mente, nyílt élőhelyek (16)	4,1–4,9 (4, 14)	L = D (14)	0–3 (2, 4, 14)	14–21 (100 %) (14)	különleges kezelést nem igényel (2, 4)	POST (2,4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (fekete imola)	P mezők, utak mente, nyílt élőhelyek (16, 19)	2,4–2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	érlelésre lehet szükség (18, 19) csírázást a sötétség gátolja (19) különleges kezelést nem igényel (5, 14, 26)	POST (5, 22, 26)	A	
Inula helenium (örménygyökér)	P nedves, zavart helyek (16)	1–1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		különleges kezelést nem igényel (4)	POST (4)	A, F	

▼M6

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam [1] és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka [2]	Ültetési mélység (mm) [3]	Csírázási idő (nap) [4]	Különleges kezelések [5]	Toxicitási vizsgálat [6]	Mag beszerzési források [7]	Egyéb hivatkozások [8]
Leontodon hispidus (közönséges oroszlánfog)	P mezők, utak mente, bolygatott területek (16, 19)	0,85-1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (17, 18, 19) különleges kezelést nem igényel (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (borzas kúpvirág)	B, P zavart (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	különleges kezelést nem igényel (4, 14, 33)	POST (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis (kanadai aranyvessző)	P legelő, nyílt területek (16)	0,06–0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14-21 (11)	keverje össze egyenlő rész homokkal és áztassa 500 ppm gibberellinsavba 24 órán keresztül (11) különleges kezelést nem igényel (4)	POST (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum (szerbtövis)	A mezők, nyílt élőhelyek (16)	25–61 (14, 29)		0(1): 5(29):		a csírázást a sötétség gátolhatja (1) áztassa meleg vízben 12 órán keresztül (29)	PRE & POST (31)	A	
Xanthium spinosum (szúrós szerbtövis)	A nyílt élőhelyek (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		sztratifikáció (14) különleges kezelést nem igényel (6)	PRE & POST (6)	A	
Xanthium strumarium (olasz szerbtövis)	A mezők, nyílt élőhelyek (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		különleges kezelést nem igényel (6, 14, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (réti kakukktorma)	P mezők, utak mente (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	a csírázást a sötétség gátolja (18, 19) különleges kezelést nem igényel (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	

▼M6

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam [1] és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka [2]	Ültetési mélység (mm) [3]	Csírázási idő (nap) [4]	Különleges kezelések [5]	Toxicitási vizsgálat [6]	Mag beszerzési források [7]	Egyéb hivatkozások [8]
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (réti kakukkszegfű)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	érlelésre lehet szükség (18) különleges kezelést nem igényel (5, 14, 15, 22–26)	POST (5, 15, 22–26)	F	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (fehér libatop)	A mezők széle, bolygatott területek (16, 19)	0,7–1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	kezelés a mag színétől függően (19) nyugalmi állapot száraz tárolóban (19) a csírázást a sötétség gátolja (1, 18, 19) hideg sztratifikáció (18) különleges kezelést nem igényel (14, 34)	PRE & POST (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (közönséges orbáncfű)	P mezők, szántóföldek, nyílt élőhelyek (16, 19)	0,1–0,23 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	a csírázást a sötétség gátolja (1, 18, 19) különleges kezelést nem igényel (5, 14, 15, 25, 27)	POST (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* (borostyánlevelű hajnalka)	A utak mente, nyílt élőhelyek, kukoricaföldek (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (1) különleges kezelést nem igényel (6, 21)	PRE & POST (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE *Cyperus rotundus* (palka)	P szántóföldek, legelők, utak mente (16, 30)	0,2 (14)	L = D (14)	0 (1) 10–20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	a csírázást a sötétség gátolja (1) különleges kezelést nem igényel (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE *Lotus corniculatus* (szarvaskerep)	P füves területek, utak mente, nyílt élőhelyek (16, 19)	1–1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	sztratifikáció (14, 19) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (18, 19) különleges kezelést nem igényel (23, 25)	POST (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼M6

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam ([1]) és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka ([2])	Ültetési mélység (mm) ([3])	Csírázási idő (nap) ([4])	Különleges kezelések ([5])	Toxicitási vizsgálat ([6])	Mag beszerzési források ([7])	Egyéb hivatkozások ([8])
Senna obtusifolia (Cassia, sarlófű)	A nedves erdő (16)	23-28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10-20 (6,9)		áztassa vízben 24 órán keresztül (9) sztratifikáció (14) a mag életképessége a színétől függően eltérő (1) különleges kezelést nem igényel (6)	POST (6,9)	A	
Sesbania exaltata (kender)	A öntéstalaj (16)	11–13 (9, 14)	L > D (9)	10–20 (9, 21)		áztassa vízben 24 órán keresztül (9) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (1) különleges kezelést nem igényel (21)	PRE & POST (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (vöröshere)	P mezők, utak mente, szántóföld (16, 19)	1,4–1,7 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	sztratifikáció (14, 18) érlelésre lehet szükség (19) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (1, 19) különleges kezelést nem igényel (5)	POST (5)	A, E, F	
LAMIACEAE *Leonurus cardiaca* (szúrós gyöngyajak)	P nyílt területek (16)	0,75–1,0 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		különleges kezelést nem igényel (4, 14)	POST (4)	F	
Mentha spicata (fodormenta)	P nedves területek (16)	2,21 (4)		0 (4)		különleges kezelést nem igényel (4)	POST (4)	F	
Nepeta cataria (illatos macskamenta)	P bolygatott területek (16)	0,54 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		különleges kezelést nem igényel (2, 4, 14)	POST (2,4)	F	

▼M6

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam [1] és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka [2]	Ültetési mélység (mm) [3]	Csírázási idő (nap) [4]	Különleges kezelések [5]	Toxicitási vizsgálat [6]	Mag beszerzési források [7]	Egyéb hivatkozások [8]
Prunella vulgaris (közönséges gyíkfű)	P szántók, füves területek, bolygatott területek (16, 19)	0,58-1,2 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	a csírázást a sötétség gátolja (18, 19) nagyobb magvak esetén jobb csírázás (1) különleges kezelést nem igényel (4, 14, 22)	POST (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (orvosi tisztesfű)	P gyepek, mezsgyék (19)	14–18 (14, 19)	L = D (14)		7 (50 %) (19)	különleges kezelést nem igényel (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
MALVACEAE *Abutilón theophrasti* (sárga selyemmályva)	A mezők, nyílt élőhelyek (16)	8,8 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	sztratifikáció (14) különleges kezelést nem igényel (5, 10, 21)	PRE & POST (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (indiai mályva)	A mezők, utak mente (16)	3,8 (14)	L = D (14)	10–20 (6, 21)		sztratifikáció (14) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (1) különleges kezelést nem igényel (6, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (mák)	A mezők, szántóföldek, bolygatott helyek (16, 19)	0,1-0,3 (4, 14, 19, 29)	L = D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	hideg sztratifikáció és szkarifikáció (1, 19, 32) különleges kezelést nem igényel (4, 14, 29)	POST (4)	A, D, E, F, G	
POACEAE *Agrostis tenuis* (cérnatippan)	pázsit, legelő (16)	0,07 (14)	L > D (IO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	a csírázást a sötétség gátolja (1, 17–19) különleges kezelést nem igényel (10)	POST (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (parlagi ecsetpázsit)	A mezők, nyílt élőhelyek (16)	0,9-1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	szkarifikáció (14) kezelje 101 mg/l KNO3-oldattal (14) meleg sztratifikáció (1) a csírázást a sötétség gátolja (1) különleges kezelést nem igényel (34)	PRE & POST (28, 34)	A	32

▼M6

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam ([1]) és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka ([2])	Ültetési mélység (mm) ([3])	Csírázási idő (nap) ([4])	Különleges kezelések ([5])	Toxicitási vizsgálat ([6])	Mag beszerzési források ([7])	Egyéb hivatkozások ([8])
Avena fatua (vadzab)	A megművelt területek, nyílt élőhelyek (16)	7–37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10-20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	szkarifikáció (7, 32) a csírázást a sötétség gátolja (1) hideg sztratifikáció (1, 18) különleges kezelést nem igényel (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (fedélrozsnok)	A mezők, utak mente, szántóföldek (16)	0,45–2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		érlelési periódus (1, 7, 32) a csírázást a fény gátolja (1) különleges kezelést nem igényel (14)	PRE & POST (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (taréjos cincor)	P mezők, utak mente, nyílt élőhelyek (16, 19)	0,5-0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (19) különleges kezelést nem igényel (14, 29)	POST (5)	A	
Digitaria sanguinalis (pirók-ujjasmuhar)	A mezők, gyepek, nyílt élőhelyek (16)	0,52–0,6 (14, 30)	L = D (14)	10–20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	szkarifikáció, hideg sztratifikáció és érlelés (1, 7, 14, 32) kezelje 101 mg/l KNO3-oldattal (14) a csírázást a sötétség gátolja (1) különleges kezelést nem igényel (21)	PRE & POST (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (közönséges kakaslábfű)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10-20 (7, 21)		szkarifikáció (7, 32) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (1) különleges kezelést nem igényel (3, 14, 21)	PRE & POST (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (észak-amerikai vadrozs)	P parti, bolygatott területek (16)	4–5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14–28 (11)	különleges kezelést nem igényel (2, 11)	POST (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (réti csenkesz)	P mezők, nedves területek (16, 19)	1,53-2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	különleges kezelést nem igényel (10, 19)	POST (10)	A	7

▼M6

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam [1] és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka [2]	Ültetési mélység (mm) [3]	Csírázási idő (nap) [4]	Különleges kezelések [5]	Toxicitási vizsgálat [6]	Mag beszerzési források [7]	Egyéb hivatkozások [8]
Hordeum pusillum (éves árpa)	A legelők, utak mente, nyílt élőhelyek (16)	3,28 (14)				meleg sztratifikáció (1) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (1)	PRE (31)		7
Phleum pratense (mezei komócsin)	P legelők, szántóföldek, bolygatott helyek (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	a csírázást a sötétség gátolja (19) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (17) különleges kezelést nem igényel (10, 14, 17, 19)	POST (10)	A, E	
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (szulák keserűfű)	A nyílt élőhelyek, utak mente (16)	5-8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		hideg sztratifikáció 4–8 hétig (1, 2, 4, 20, 29) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (1)	PRE & POST 1, 2, 20, 28, 31	A	32
Polygonum lapathifolium (lapulevelű keserűfű)	A nedves talaj (16)	1,8-2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (1) a csírázást a sötétség gátolja (18) hideg sztratifikáció (1) különleges kezelést nem igényel (5)	PRE & POST (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum (pennsylvaniai borsos keserűfű)	A mezők, nyílt élőhelyek (16)	3,6-7 (14, 29)		2 (29)		hideg sztratifikáció 4 héten át 0–5 °C hőmérsékleten (1, 29) a csírázást a sötétség gátolja (1)	PRE (31)	A, E	
Polygonum periscaria (baracklevelű keserűfű)	A bolygatott területek, szántóföld (16, 19)	2,1-2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	szkarifikáció, hideg sztratifikáció, gibberellinsav-kezelés (14) hideg sztratifikáció, érlelés (17–19) a csírázást a sötétség gátolja (19) különleges kezelést nem igényel (13)	POST (13)	A	32

▼M6

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam ([1]) és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka ([2])	Ültetési mélység (mm) ([3])	Csírázási idő (nap) ([4])	Különleges kezelések ([5])	Toxicitási vizsgálat ([6])	Mag beszerzési források ([7])	Egyéb hivatkozások ([8])
Rumex crispus (bodros lórom)	P szántóföldek, utak mente, nyílt területek (16, 19)	1,3-1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	a csírázást a sötétség gátolja (18, 19) érlelésre lehet szükség (18) különleges kezelést nem igényel (4, 14, 33)	POST (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (mezei tikszem)	A szántók, nyílt területek, bolygatott területek (16, 19)	0,4-0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	hideg sztratifikáció, gibberellinsav-kezelés (1, 14, 18, 19, 32) a csírázáshoz fényre van szükség (1) különleges kezelést nem igényel (2, 4)	POST (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (réti boglárka)	P szántóföldek, utak mente, nyílt területek (16, 19)	1,5-2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41-56 (19, 29)	különleges kezelést nem igényel (5, 14, 22, 24–26)	POST (5, 22, 24–26)		32
ROSACEAE *Geum urbanum* (erdei gyömbérgyökér)	P sövények, nedves területek (16, 19)	0,8–1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	a csírázást a sötétség gátolja (18, 19) meleg sztratifikáció (1) különleges kezelést nem igényel (5, 14, 22, 25, 26)	POST (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE *Galium aparine* (ragadós galaj)	A szántók, nedves területek, bolygatott területek (16, 19)	7–9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	hideg sztratifikáció (1, 18, 19) a csírázást a besugárzás nem befolyásolja (18, 19) a csírázást a fény gátolja (1) különleges kezelést nem igényel (6, 14)	PRE & POST (6, 28)	A	32

▼M6

CSALÁD Faj botanikai neve (közismert magyar név)	Élettartam [1] és előfordulási hely	Mag tömege (mg)	Csírázás vagy növekedés megvilágítási időszaka [2]	Ültetési mélység (mm) [3]	Csírázási idő (nap) [4]	Különleges kezelések [5]	Toxicitási vizsgálat [6]	Mag beszerzési források [7]	Egyéb hivatkozások [8]
Galium mollugo (közönséges galaj)	P sövényfalak, nyílt területek (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		különleges kezelést nem igényel (5, 14, 22, 24, 26, 29)	POST (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (piros gyűszűvirág)	B, P sövények, nyílt területek (16, 19)	0.1–0.6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	a csírázást a sötétség gátolja (1, 17–19) különleges kezelést nem igényel (4, 22–26)	POST (4, 22–26)	D, G, F	
Veronica persica (perzsa veronika)	A szántók, nyílt területek, bolygatott területek (16, 19)	0,5–0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3(19): 5 (96 %) (18)	a csírázást a sötétség gátolja (18, 19) hideg sztratifikáció (18) különleges kezelést nem igényel (14)	PRE & POST (28)	A	32

([1]) A = Egynyári, B = Kétnyári, P = évelő.
([2]) A 11.,14. és 33. irodalom a csírázás kiváltásához szükséges fény (L) és sötétség (D) arányát mutatja be. A 3., 6., 9., 10., 13. és 20. irodalom az üvegházakban szükséges növekedési feltételeket mutatja be.
([3]) A 0 mm azt jelzi, hogy magokat a talaj felszínén vetették el vagy a magoknak fényre van szükségük a csírázáshoz.
([4]) A megadott számok a napok számát jelentik, amely alatt a magok egy adott százaléka kicsírázott a megadott irodalom szerint, pl. 3 nap (50 %) csírázás (19. irodalom).
([5]) Az érés és/vagy sztratifikáció időtartama nem mindig áll rendelkezésre. A hideg kezelésre vonatkozó követelmény kivételével a hőmérsékleti feltételek nincsenek meghatározva az üvegházi kísérletekben, mivel korlátozott a hőmérséklet-szabályozás lehetősége. A legtöbb mag kicsírázik az üvegházakban tapasztalható normál hőmérsékletingadozás mellett.
([6]) Azt jelzi, hogy a fajt csírázás előtti (PRE) és/vagy csírázás utáni (POST) herbicidekkel végzett növényi toxicitási vizsgálatban használták-e fel.
([7]) Példát (példákat) ad a kereskedelmi vetőmag-beszállítókra.
([8]) Megad két figyelembe vett alternatív irodalmat.

▼**M6**

Hivatkozott vetőmag-beszállítók

Beszállítói azonosító	A beszállítókra vonatkozó információk
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

IDÉZETT IRODALOM

(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. Vizsgálatok és Anyagok Amerikai Szabványügyi Intézete, Philadelphia. pp 197 – 208.

▼**M6**

(7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.

(8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge

(9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. Weed Science, 48:481-486.

(10) Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC – Weeds. pp. 151 – 156.

(11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Personal communication. (www.ernstseed.com)

(12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. Environmental Toxicology & Chemistry, 9:769-776.

(13) Fletcher, J.S., Pfleeger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. Environmental Toxicology & Chemistry, 15(7):1189-1196.

(14) Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid)

(15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. Environmental Pollution, 114:21-28.

(16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY

(17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. Annals of Applied Biology, 98:555-558.

(18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology, 69:1017-1059.

(19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London

(20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (Polygonum convolvulus L.). Weed Research, 34, 453-459.

(21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. Weed Science, 40:227-232.

(22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. Environmental Pollution, 59:71-86.

(23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. Environmental Pollution, 69:223-235.

(24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. Environmental Pollution, 73:25-42.

(25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. Agriculture, Ecosystems, & Environment, 45:283-293.

▼**M6**

(26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. Journal of Environmental Management, 50:369-388.

(27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. BCPC – Weeds. pp. 1021-1028.

(28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. Pest Management Science, 58:1161-1174.

(29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (http://www.herbiseed.com)

(30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (http://plants.usda.gov). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA

(31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].

(32) Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.

(33) White, A. L. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Personal communication.

(34) Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh., 17:711-718.

▼**M6**

4. függelék

Példák bizonyos terményfajok megfelelő növekedési feltételeire

Az alábbi feltételeket alkalmasnak találták 10 terményfaj esetében, és iránymutatásként lehet használni a növesztőkamrában végzett vizsgálatokhoz bizonyos egyéb fajok esetében is:

A szén-dioxid koncentrációja. 350 ± 50 ppm;

Relatív páratartalom: 70 ± 5 % a megvilágított időszakokban és 90 ± 5 % a sötét időszakokban;

Hőmérséklet: 25 ± 3 °C nappal, 20 ± 3 °C éjjel;

Megvilágítási időszak 16 óra megvilágítás/8 óra sötétség, 400–700 nm átlagos hullámhosszat feltételezve;

Fény: a fényerő 350 ± 50 μE/m^2/s, a növény tetején mérve.

A terményfajok a következők:

— paradicsom (*Solanum lycopersicon*);

— uborka (*Cucumis sativus*);

— saláta (*Lactuca sativa*);

— szója (*Glycine max*);

— káposzta (*Brassica oleracea* var. *capitata*);

— sárgarépa (*Daucus carota*);

— zab (*Avena sativa*);

— évelő perjemag (*Lolium perenne*);

— kukorica (*Zea mays*);

— vöröshagyma (*Allium cepa*).

▼M6

C.32. TELEVÉNYFÉRGEK SZAPORODÁSÁNAK VIZSGÁLATA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 220. vizsgálati iránymutatásában (2004) leírt módszerrel. A vizsgálat célja a vegyi anyagoknak az *Enchytraeus albidus* (Henle 1873) televényférgek reprodukciós teljesítményére a talajban kifejtett hatásának értékelése. A vizsgálat alapvetően az Umweltbundesamt, Németország által kifejlesztett módszeren alapul (1), amelyet körvizsgálattal ellenőriztek (2). A vegyi anyagok televényférgekre és földigilisztákra gyakorolt toxicitására vonatkozó egyéb vizsgálati módszereket is figyelembe vettek (3) (4) (5) (6) (7) (8).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

2. Az *Enchytraeus* nemzetségbe tartozó talajlakó annelid férgek ökológiailag releváns fajok az ökotoxikológiai vizsgálatok szempontjából. Míg a televényférgek gyakran megtalálhatók földigilisztákat tartalmazó talajokban, gyakran bőségesen előfordulnak olyan talajokban is, ahonnan a földigiliszták hiányoznak. A televényférgeket laboratóriumi vizsgálatok, valamint félterepés terepvizsgálatok céljára is lehet használni. Gyakorlati szempontból számos *Enchytraeus* faj könnyen kezelhető és tenyészthető, és a generációs idejük lényegesen rövidebb, mint a földigilisztáké. A televényférgekkel végzett reprodukciós vizsgálat időtartama ezért csak 4–6 hét, míg a földigilisztákkal (*Eisenia fetida*) végzett vizsgálaté 8 hét.

3. A szárazföldi környezetben élő televényférgekre vonatkozó alapvető ökológia és ökotoxikológiai információk a (9) (10) (11) (12) szakirodalmi hivatkozásban találhatók.

A VIZSGÁLAT ELVE

4. Kifejlett televényférgeket teszünk ki a vizsgált vegyi anyag mesterséges talajba kevert koncentrációsorozatának. A vizsgálat két lépésből áll: a) dózisbehatároló vizsgálat (ha nem áll elegendő információ rendelkezésre), amelyben a kéthetes expozíció után mért mortalitás a fő végpont, illetve b) meghatározó szaporodásvizsgálat, amely során a szülő állat által nemzett összes utódot és a szülő állatok túlélési arányát értékelik. A meghatározó vizsgálat időtartama hat hét. Az első három hét után a kifejlett férgeket eltávolítjuk, és a morfológiai változásokat jegyzőkönyvezzük. Újabb három hét múlva megszámoljuk a kifejlett férgek által előállított bábokból kikelt utódokat. A vizsgált vegyi anyagnak kitett állatok reprodukciós teljesítményét összehasonlítjuk a kontrollcsoporttal (vagy -csoportokkal) i. az észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC) és/vagy ii. az EC_x (például EC_{10}, EC_{50}) meghatározása érdekében. Ez utóbbinál regressziós modell segítségével becsüljük meg azt a koncentrációt, amely x %-kal csökkenti a reprodukciós teljesítményt. Az EC_x (például EC_{10}, EC_{50}) értékének a vizsgálati koncentrációk által meghatározott tartományon belül kell elhelyezkednie annak érdekében, hogy az EC_x értékét extrapoláció helyett interpolációval lehessen meghatározni.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

5. A vizsgált vegyi anyag vízben való oldhatóságának, log K_{ow} értékének, talaj-víz megoszlási hányadosának (pl. e melléklet C.18. vagy C19. fejezete) és gőznyomásának lehetőleg ismertnek kell lennie. Kívánatosak a vizsgált vegyi anyag talajban bekövetkező sorsára vonatkozó további információk, mint például a fotolízis és a hidrolízis sebessége.

6. Ez a vizsgálati módszer vízben oldható vagy oldhatatlan vegyi anyagok esetében egyaránt használható. A vizsgált vegyi anyag alkalmazásának módja azonban ennek megfelelően eltérő lesz. A vizsgálati módszer nem alkalmazható illékony vegyi anyagok esetében, azaz olyan vegyi anyagoknál, amelyek Henry-féle állandója vagy levegő-víz megoszlási hányadosa nagyobb, mint egy, illetve olyan vegyi anyagok esetében, amelyek gőznyomása 25 °C-on meghaladja a 0,0133 Pa értéket.

▼M6

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

7. A vizsgálat érvényességéhez az alábbi teljesítménykritériumoknak kell teljesülniük a kontrollcsoport(ok)ban:

— a kifejlett férgek mortalitási aránya nem haladhatja meg a 20 %-ot a dózisbehatároló vizsgálat végén és a reprodukciós teszt első három hetében.

— feltételezve, hogy edényenként 10 férget használunk a vizsgálat összeállítása során, edényenként átlagosan legalább 25 fiatal egyedet kell előállítani a vizsgálat végéig.

— a fiatal egyedek átlagos számának relatív szórása nem haladhatja meg az 50 %-ot a reprodukciós vizsgálat végén.

Ha a vizsgálati nem felel meg a fenti érvényességi kritériumoknak, a vizsgálatot abba kell hagyni, kivéve, ha a vizsgálat folytatása megfelelően indokolható. Az indoklást a vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell.

REFERENCIA-VEGYIANYAG

8. Szabályos időközönként vagy esetleg minden vizsgálat keretében tesztelni kell egy referencia-vegyianyagot annak ellenőrzésére, hogy a vizsgált szervezetek által adott válasz nem változott jelentősen az idő múlásával. Megfelelő referencia-vegyianyag a karbendazim, amelyről kimutatták, hogy befolyásolja a televényférgek túlélési arányát és reprodukcióját (13) (14), valamint egyéb olyan anyagokat is lehet használni, amelyek toxicitási adatai jól ismertek. A körvizsgálatban az AgrEvo Company (Frankfurt, Németország) által szállított, Derosal ™ kereskedelmi néven ismert karbendazim-készítményt használták, amely 360 g/l (32,18 %) hatóanyagot tartalmaz (2). A körvizsgálatban meghatározott reprodukciós EC_{50} érték az 1,2 ± 0,8 mg hatóanyag (a.i.)/kg száraz tömeg tartományban helyezkedett el (2). Amennyiben a vizsgálati sorozat pozitív toxikus standardot is tartalmaz, egyetlen koncentrációt kell alkalmazni, és az ismétlések számának meg kell egyeznie a kontrolloknál használt ismétlésszámmal. A karbendazim esetében az 1,2 mg hatóanyag/kg száraz tömeg (folyékony készítményként) vizsgálata ajánlott.

A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

Berendezések

9. A vizsgálati edények üvegből vagy más, kémiailag semleges anyagból legyenek. Az üvegedények (pl. térfogat: 0,20–0,25 liter; átmérő: ≈ 6 cm) alkalmasak erre a célra. Az edényeket átlátszó (pl. üveg vagy polietilén) fedéllel kell lefedni, aminek célja, hogy csökkentse a víz elpárolgását, miközben lehetővé teszi a gázcserét a talaj és a légkör között. A fedélnek átlátszónak kell lennie, hogy áteressze a fényt.

10. Általános laboratóriumi felszerelések, így különösen a következők szükségesek:

— szárítószekrény;

— sztereomikroszkóp;

— pH-mérő és fotométer;

— megfelelő pontos mérlegek;

— megfelelő hőmérséklet-szabályozó eszközök;

— megfelelő páratartalom-szabályozó eszközök (nem szükséges, ha az expozíciós edényeknek van fedele);

— inkubátor vagy kis helyiség klímaberendezéssel;

— csipeszek, horgok vagy hurkok;

— fotótál.

A mesterséges talaj előkészítése

11. Ebben a vizsgálatban mesterséges talajt használunk (5) (7), amelynek összetétele a következő (száraz tömegek alapján, 105 °C-on állandó tömegig szárítva):

▼M6

— 10 % tőzegmoha, levegőn szárított és finomra őrölt (a 2 ± 1 mm részecskeméret fogadható el); a vizsgálatban való felhasználás előtt ajánlott ellenőrizni, hogy a friss tőzegtétellel készített talaj alkalmas-e a férgek tenyésztésére;

— 20 % kaolinagyag (lehetőleg 30 % feletti kaolinittartalommal);

— körülbelül 0,3–1,0 % kalcium-karbonát ($CaCO_3$, porított, analitikai tisztaságú) pH = 6,0 ± 0,5 eléréséhez; a hozzáadandó kalcium-karbonát mennyisége elsősorban a tőzeg minőségétől/jellegétől függ;

— körülbelül 70 % levegőn szárított kvarchomok (a $CaCO_3$ szükséges mennyiségétől függően), túlnyomórészt finom homok, a részecskék legalább 50 %-a 50–200 mikron között legyen.

A talaj meghatározó vizsgálatban való használata előtt célszerű igazolni, hogy a mesterséges talaj alkalmas a férgek tenyésztésére és a vizsgálat érvényességi kritériumainak teljesítésére. Különösen ajánlott ilyen ellenőrzést végezni annak biztosítása érdekében, hogy a vizsgálat elvégzése nem sérül, ha a mesterséges talaj szerves széntartalmát lecsökkentik, pl. a tőzegtartalom 4–5 %-ra való csökkentésével és a homoktartalom megfelelő növelésével. A szerves széntartalom csökkentése esetén kisebb a lehetősége a vizsgált vegyi anyag talajon (szerves szénen) való adszorbeálódásának, miközben a vizsgált vegyi anyag hozzáférhetősége a férgek számára javul. Kimutatták, hogy a fentebb említettnél alacsonyabb – például 2,7 % (15) – szerves széntartalmú természetes talajokban vizsgált *Enchytraeus albidus* esetében a szaporodással kapcsolatos érvényességi kritériumok teljesülnek, és az eddigi – bár korlátozott – tapasztalatok szerint ez az 5 %-os tőzegtartalmú mesterséges talajjal is elérhető.

Megjegyzés: Ha a további (pl. magasabb szintű) vizsgálatok során természetes talajt használunk, a talaj alkalmasságát és a vizsgálat érvényességi feltételeinek teljesítését is demonstrálni kell.

12. A talaj száraz összetevőit alaposan összekeverjük (például nagyüzemi méretű laboratóriumi keverőgéppel). Ezt legalább egy héttel a vizsgálat megkezdése előtt kell megtenni. A kevert talajt két napig tárolni kell annak érdekében, hogy a savassága egyensúlyba kerüljön/stabilizálódjon. A pH-érték meghatározása céljából a talajból és 1 mólos kálium-klorid (KCl) vagy 0,01 mólos kalcium-klorid ($CaCl_2$) oldatból készült 1:5 arányú keveréket használunk (lásd a (16) szakirodalmi hivatkozást és a 3. függeléket). Ha a talaj az elvárt tartománynál savasabb (lásd a 11. pontot), a pH-t megfelelő mennyiségű $CaCO_3$ hozzáadásával lehet beállítani. Ha a talaj túl lúgos, a 11. pontban említett – $CaCO_3$ nélkül készített – keverék hozzáadásával lehet beállítani.

13. A mesterséges talaj maximális víztartó képességét (WHC) a 2. függelékében leírt eljárásokkal összhangban kell meghatározni. Egy vagy két nappal a vizsgálat megkezdése előtt a száraz mesterséges talajt előnedvesítjük annyi ionmentesített víz hozzáadásával, hogy a végső víztartalom (a maximális víztartó képesség 40–60 %-a) körülbelül felét kapjuk A vizsgálat kezdetén az előnedvesített talajt részekre kell osztani a vizsgálati koncentrációk (és adott esetben a referencia-vegyianyagok), illetve a vizsgálatban használt kontrollok számának megfelelően. A nedvességtartalmat a maximális WHC 40–60 %-ára kell beállítani a vizsgált vegyi anyag oldatának

▼M6

és/vagy desztillált vagy deionizált víz hozzáadásával (lásd a 19–21. pontot). A nedvességtartalmat a vizsgálat elején és végén is meg kell határozni (105 °C-on tömegállandóságig történő szárítással), és annak a férgek túléléséhez optimális tartományon belül kell lennie. A talaj nedvességtartalmának durva ellenőrzésére alkalmas módszer, ha enyhén megnyomjuk a talajt a kezünkben, és ha a nedvességtartalom megfelelő, kis vízcseppek jelennek meg az ujjaink között.

A vizsgálati állatok kiválasztása és előkészítése

14. Az ajánlott vizsgálati faj az *Enchytraeus albidus* (Henle 1837, fehér televényféreg), amely *Enchytraeidae* család tagja (*Oligochaeta* rend, *Annelida* törzs). Az *E. albidus* a telvényférgek egyik legnagyobb méretű faja, már 35 mm hosszúságú példányokat is feljegyeztek (17) (18). Az *E. albidus* világszerte elterjedt és egyaránt megtalálható a tengeri, édesvízi és szárazföldi élőhelyeken, elsősorban bomló szerves anyagokban (moszat, komposzt), illetve ritkán réteken is (9). A faj széles ökológiai toleranciája és néhány morfológiai eltérés azt jelzi, hogy különböző fajtái létezhetnek.

15. Az *E. albidus* haleledelként kereskedelmi forgalomban kapható. Ellenőrizni kell, hogy a tenyészetben ne legyenek más, általában kisebb fajok (1) (19). A tenyészet ilyen szennyeződése esetén az összes férget át kell mosni vízzel egy Petri-csészében. Az *E. albidus* nagy kifejlett példányait kell ezután kiválasztani (sztereómikroszkóp segítségével) az új kultúra elindításához, a többi férget pedig ki kell dobni. Az *E. albidust* könnyen, sokféle szerves anyagban lehet tenyészteni (lásd a 4. függeléket). Az *E. albidus* életciklusa rövid, mivel a teljes érettséget 33 nap (18 °C-on) és 74 nap (12 °C-on) között éri el (1). Kizárólag a laboratóriumban legalább 5 hétig (egy generáción át) probléma nélkül tartott kultúrák használhatók fel a vizsgálathoz.

16. Az *Enchytraeus* nemzetség más fajai is alkalmasak a vizsgálatra, pl. az *E. buchholzi* (Vejdovsky 1879) vagy az *E. crypticus* (Westheide & Graefe 1992) (lásd az 5. függeléket). Más televényféreg fajok használata esetén a használt fajt egyértelműen azonosítani, a választást pedig indokolni kell a jegyzőkönyvben.

17. A vizsgálatban felhasznált állatok kifejlett férgek. Petékkel (fehér foltok) kell rendelkezniük a clitellum régióban, és a méretüknek megközelítőleg azonosnak kell lennie (körülbelül 1 cm-es hosszúság). A tenyészkultúrát nem szükséges szinkronizálni.

18. Ha a televényférgeket nem a végső vizsgálathoz használt talajban és feltételek mellett tenyésztik (beleértve a táplálást), akkor legalább 24 órán keresztül, de legfeljebb három napig akklimatizálni kell őket. A vizsgálat elvégzéséhez szükséges mennyiségnél nagyobb számú kifejlett egyedet kell akklimatizálni, hogy lehetőség legyen a sérült, vagy más okból alkalmatlan példányok kizárására. Az akklimatizációs időszak végén csak a petéket tartalmazó és viselkedési rendellenességeket (pl. a féreg próbál kimenekülni a talajból) nem mutató férgeket választjuk ki a vizsgálathoz. A férgeket ékszerészcsipesszel, horoggal vagy hurokkal óvatosan kell eltávolítani és kis mennyiségű friss vizet tartalmazó Petri-csészébe helyezni. Erre a célra az e melléklet C.20. fejezetében (*Daphnia magna* szaporodásának vizsgálata) javasolt mesterséges friss vizet kell előnyben részesíteni, mert az ionmentesített, ioncserélt vagy csapvíz káros lehet a férgekre. A férgeket sztereomikroszkóp alatt meg kell vizsgálni, és a petéket nem tartalmazó férgeket ki kell dobni. Ügyelni kell a kultúrákat esetleg megfertőző atkák vagy ugróvillások eltávolítására és kidobására. A vizsgálat során fel nem használt egészséges férgeket vissza kell helyezni a törzstenyészetbe.

▼M6

A vizsgálati koncentrációk előkészítése

Vízben oldódó vegyi anyagok

19. A vizsgált anyagból ionmentesített vízben olyan mennyiségű oldatot kell készíteni, amely az adott vizsgálati koncentráció összes ismétléséhez elegendő. Javasolt a kívánt nedvességtartalom (azaz a maximum WHC 40–60 %-a) eléréséhez szükséges mennyiségű vizet használni (lásd a 13. pontot). A vizsgált vegyi anyag mindegyik oldatát alaposan össze kell keverni egy tétel előnedvesített talajjal a vizsgálati edénybe helyezés előtt.

Vízben oldhatatlan vegyi anyagok

20. Vízben oldhatatlan, de szerves oldószerekben oldódó vegyi anyagok esetében a vizsgált vegyi anyagot fel lehet oldani egy megfelelő hordozó (például aceton) lehető legkisebb mennyiségében. Csak illékony oldószereket szabad használni. A hordozót rápermetezzük vagy összekeverjük kis mennyiségű (például 2,5 g) finom kvarchomokkal. A hordozót elszívó fülkében legalább egy órán keresztül történő párologtatással eltávolítjuk. A kvarchomok és a vizsgált vegyi anyag e keverékét hozzáadjuk az előnedvesített talajhoz, és megfelelő mennyiségű ionmentesített víz hozzáadása után alaposan elkeverjük úgy, hogy a szükséges nedvességtartalmat kapjuk. A végtermékként kapott keveréket a vizsgálati edényekbe töltjük.

21. Vízben és szerves oldószerekben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok esetén a kívánt vizsgálati koncentráció eléréséhez vizsgálati edényenként 2,5 g finomra őrölt kvarchomokot keverünk össze a vizsgált vegyi anyag megfelelő mennyiségével. A kvarchomok és a vizsgált vegyi anyag e keverékét hozzáadjuk az előnedvesített talajhoz, és alaposan elkeverjük megfelelő mennyiségű ionmentesített vízzel úgy, hogy a szükséges nedvességtartalmat kapjuk. A végtermékként kapott keveréket elosztjuk a vizsgálati edények között. Az eljárást megismételjük minden egyes vizsgált koncentráció esetében és egy megfelelő kontrollt is készítünk.

22. A vegyi anyagokat általában nem kell 1 000 mg/kg száraz talaj koncentrációt meghaladó koncentrációban vizsgálni. A magasabb koncentrációban történő vizsgálat azonban az adott vizsgálat céljainak függvényében szükséges lehet.

A VIZSGÁLAT ELVÉGZÉSE

Vizsgálati csoportok és kontrollok

23. Minden vizsgálati koncentráció esetében 20 g száraz tömegnek megfelelő mennyiségű vizsgálati talajt töltünk a vizsgálati edénybe (lásd a 19–21. pontot). A vizsgált vegyi anyagot nem tartalmazó kontrollokat is készítünk. Táplálékot adunk minden egyes edényhez a 29. pontban leírt eljárásnak megfelelően. Minden vizsgálati edényhez tíz véletlenszerűen kiválasztott férget rendelünk. A férgeket óvatosan helyezzük át a vizsgálati edényekbe és a talaj felszínén helyezzük el őket például ékszerészcsipesz, horog vagy hurok használatával. A vizsgált koncentrációk és a kontrollok ismétléseinek száma az alkalmazott vizsgálati tervtől függ (lásd a 34. pontot). A vizsgálati edényeket véletlenszerűen helyezzük el a vizsgálati inkubátorban, és pozíciójukat hetente újra véletlenszerűen megváltoztatjuk.

24. Ha hordozót használunk a vizsgált vegyi anyag bevitelére, a vizsgálati sorozat mellett egy oldószerrel permetezett vagy összekevert kvarchomokot tartalmazó kontrollsorozatot is le kell futtatni. Az oldószer vagy diszpergálószer koncentrációjának meg kell egyeznie a vizsgált vegyi anyagot tartalmazó edényekben használt koncentrációval. Egy többlet kvarchomokot (edényenként 2,5 g) tartalmazó kontrollsorozatot kell futtatni a 21. pontban leírt eljárás szerinti bevitelt igénylő vegyi anyagok esetén.

▼M6

Vizsgálati körülmények

25. A vizsgálati hőmérséklet 20 ± 2 °C. A férgek kedvét a talaj elhagyásától úgy lehet elvenni, ha a vizsgálatot ellenőrzött világos-sötét ciklusok szerint végezzük (lehetőleg 16 óra világos és 8 óra sötét), 400–800 lux megvilágítással a vizsgálati edények területén.

26. A talajnedvesség ellenőrzése érdekében az edényeket a vizsgálat kezdetén, majd azt követően hetente egyszer lemérjük. A tömegveszteséget megfelelő mennyiségű ionmentesített víz hozzáadásával pótoljuk. Megjegyzendő, hogy a vízveszteség csökkenthető, ha a vizsgálati inkubátorban magas levegőpáratartalmat (> 80 %) tartunk fenn.

27. A nedvességtartalmat és a pH-t a dózisbehatároló vizsgálat és a meghatározó vizsgálat elején és végén egyaránt meg kell mérni. Méréseket kell végezni a kontroll- és a kezelt (minden koncentrációval) talajmintákon is, amelyeket ugyanúgy készítünk el és tartunk fenn, mint a vizsgált tenyészeteket, azonban férgeket nem tartalmaznak. Táplálékot csak a vizsgálat kezdetekor lehet ezekhez a talajmintákhoz adni a mikrobiális aktivitás elősegítése céljából. A hozzáadott táplálék mennyiségének a vizsgálati tenyészetekhez adott táplálék mennyiségével kell megegyeznie. Ezekhez az edényekhez a vizsgálat időtartama alatt nem szükséges további táplálékot hozzáadni.

Táplálás

28. A televényféreg populáció fenntartására alkalmas táplálék használható. A mikrobiológiai szennyeződés elkerülése érdekében a használat előtt lehetőleg autoklávozott (a felmelegítés is megfelelő) zabpelyhet megfelelő tápláléknak találták.

29. A táplálékot először a férgek behelyezése előtt adjuk hozzá úgy, hogy 50 mg őrölt zabpelyhet keverünk össze a talajjal minden edényben. Ezt követően hetente egyszer adunk táplálékot maximum a 21. napig. A 28. napon etetésre nem kerül sor, mivel a kifejlett egyedeket ebben a szakaszban már eltávolítottuk, és a fiatal férgeknek ezen a ponton túl viszonylag kevés további táplálékra van szüksége. A vizsgálat során az etetés abból áll, hogy a tartályban 25 mg őrölt zabpelyhet helyezünk el a talaj felszínén, vigyázva, nehogy megsebesítsük a férgeket. A gombák szaporodásának csökkentése érdekében a zabpelyhet kis mennyiségű talaj ráhelyezésével el kell temetni a talajban. Ha el nem fogyasztott táplálék marad meg, a fejadagot csökkenteni kell.

A dózisbehatároló vizsgálat terve

30. Szükség esetén dózisbehatároló vizsgálatot kell végezni, például a vizsgált vegyi anyag öt koncentrációjával (0,1, 1,0, 10, 100 és 1 000 mg/kg (száraz talajtömeg)). Kezelésenként és kontrollonként elegendő egy ismétlés.

31. A dózisbehatároló vizsgálat időtartama két hét. A vizsgálat végén értékeljük a férgek mortalitási arányát. A férgeket elpusztultként jegyzőkönyvezzük, ha az anterior végére gyakorolt mechanikai ingerre nem reagál. A mortalitáson kívüli egyéb információk szintén hasznosak lehetnek annak eldöntésében, hogy milyen koncentrációtartomány használandó a meghatározó vizsgálatban. A kifejlett férgek viselkedésében (pl. a talajba való beásásra való képtelenség; mozdulatlanul fekvés a vizsgálati edény üvegfala mentén) és morfológiájában (pl. nyílt sebek jelenléte) mutatkozó elváltozásokat is fel kell ezért jegyezni a megjelenő fiatal egyedekkel együtt. Az utóbbit a 6. függelékben leírt festési módszerrel lehet meghatározni.

32. Az LC_{50} hozzávetőleges értékét meg lehet határozni a mortalitási adatok geometriai átlagának kiszámításával. A meghatározó vizsgálat koncentrációs tartományának megállapítása során a szaporodásra gyakorolt hatásról azt feltételezzük, hogy az LC_{50}-nél akár 10-szer alacsonyabb is lehet. Ez azonban egy empirikus kapcsolat, és a valóság a konkrét esetben ettől eltérő

▼M6

lehet. A dózisbehatároló vizsgálat során tett további megfigyelések, mint például a fiatal egyedek előfordulása, segíthet pontosítani a vizsgált vegyi anyagnak a meghatározó vizsgálatban használandó koncentrációtartományát.

33. Az LC_{50} pontos meghatározására érdekében ajánlott a vizsgálatot a vizsgált vegyi anyag valamennyi koncentrációja esetében legalább négy ismétlésben és annyi koncentrációban elvégezni, amennyi legalább négy statisztikailag szignifikánsan különböző átlagos választ idéz elő. Hasonló számú koncentrációt és a (ha szükséges) párhuzamos kontrollt használunk.

A meghatározó reprodukciós vizsgálat elrendezése

34. Három elrendezést javasolnak egy körvizsgálat ajánlásai alapján (2).

— A NOEC meghatározásához mértani sorozatba rendezett legalább öt koncentrációt kell vizsgálni. Minden egyes kísérleti koncentráció esetében négy ismétlést plusz nyolc kontrollt javasolnak. A szomszédos koncentrációk aránya nem lehet 1,8-nél nagyobb.

— Az EC_x (például EC_{10}, EC_{50}) meghatározásához legalább öt koncentrációt kell megvizsgálni, és a koncentrációknak körbe kell fogniuk az EC_x értékét annak érdekében, hogy az EC_x-et extrapoláció helyett interpolációval lehessen meghatározni. Minden egyes kísérleti koncentráció esetében legalább négy ismétlést és négy kontroll ismétlést javasolnak. A szomszédos koncentrációk aránya változtatható, azaz a várt hatástartományban legfeljebb 1,8-re, a magasabb és az alacsonyabb koncentrációknál 1,8-nél nagyobb értékre vehető fel.

— Egy kombinált módszer lehetővé teszi mind a NOEC, mind az EC^x meghatározását. Nyolc kezelési koncentrációt kell használni mértani sorozatban. Kezelésenként négy ismétlés plusz nyolc kontroll ajánlott. A szomszédos koncentrációk aránya nem lehet 1,8-nél nagyobb.

35. Vizsgálati edényenként tíz kifejlett férget kell használni (lásd a 23. pontot). Eledelt a vizsgálati edénybe a vizsgálat kezdetekor, majd hetente egyszer adnak (lásd a 29. pontot) a 21. nappal bezárólag. A 21. napon a talajmintákat kézzel gondosan átvizsgálják, az élő kifejlett férgeket megfigyelik és megszámolják, illetve a magatartásbeli (pl. a féreg képtelen beásni magát a talajba vagy mozdulatlanul fekszik a vizsgálati edény üvegfala mentén) és a morfológiai változásokat (pl. nyílt sebek) feljegyzik. A kifejlett férgeket ezután eltávolítják a vizsgálati edényből és a vizsgálati talajból. Az előállított bábokat tartalmazó vizsgálati talajt három további hétig inkubálják megegyező vizsgálati körülmények között, kivéve, hogy etetésre csak a 35. napon kerül sor (25 mg őrölt zabpehely edényenként).

36. Hat hét után megszámolják a frissen kikelt férgeket. A bengálvörös festésen alapuló módszer (lásd a 6. mellékletet) ajánlott, bár más nedves (de hőt nem használó) extrakciós és lebegéses technikák (lásd a 6. mellékletet) is alkalmasnak bizonyultak (4) (10) (11) (20). A bengálvörös festés ajánlott, mivel a táptalajból történő nedves extrakciót nagyban gátolhatja a szuszpendált agyagrészecskék okozta zavarosság.

Határérték-vizsgálat

37. Ha a dózisbehatároló vizsgálat során nem figyelhető meg hatás a legmagasabb koncentrációban (azaz az 1 000 mg/kg koncentrációban), a reprodukciós vizsgálatot határérték-vizsgálatként lehet elvégezni az 1 000 mg/kg használatával annak bizonyítására, hogy a szaporodásra vonatkozó NOEC nagyobb mint ez az érték.

▼M6

Összegzés és a vizsgálat ütemterve

38. A vizsgálat lépései a következőképpen foglalhatók össze:

Időpont	Dózisbehatároló vizsgálat	Meghatározó vizsgálat
–7. nap vagy korábban	— a mesterséges talaj elkészítése (a száraz alkotóelemek összekeverése)	— a mesterséges talaj elkészítése (a száraz alkotóelemek összekeverése)
–5. nap	— a mesterséges talaj pH-jának ellenőrzése — a talaj maximális WHC értékének mérése	— a mesterséges talaj pH-jának ellenőrzése — a talaj maximális WHC értékének mérése
a –5. naptól a –3. napig	— a férgek kiválasztása az akklimatizációra	— a férgek kiválasztása az akklimatizációra
a –3. naptól a 0. napig	— a férgek akklimatizációja legalább 24 órán keresztül	— a férgek akklimatizációja legalább 24 órán keresztül
–1. nap	— a mesterséges talaj előnedvesítése és tételekre osztása	— a mesterséges talaj előnedvesítése és tételekre osztása
0. nap	— a törzsoldatok elkészítése — a vizsgált vegyi anyag alkalmazása — a vizsgálati szubsztrátum bemérése a vizsgálati edényekbe — az eledel bekeverése — a férgek bevitele — a talaj pH-jának és nedvességtartalmának mérése	— a törzsoldatok elkészítése — a vizsgált vegyi anyag alkalmazása — a vizsgálati szubsztrátum bemérése a vizsgálati edényekbe — az eledel bekeverése — a férgek bevitele — a talaj pH-jának és nedvességtartalmának mérése
7. nap	— a talaj nedvességtartalmának ellenőrzése	— a talaj nedvességtartalmának ellenőrzése — eledel
14. nap	— a kifejlett egyedek mortalitásának meghatározása — a fiatal egyedek számának becslése — a talaj pH-jának és nedvességtartalmának mérése	— a talaj nedvességtartalmának ellenőrzése — eledel
21. nap		— a kifejlett egyedek viselkedésének megfigyelése — a kifejlett egyedek eltávolítása — a kifejlett egyedek mortalitásának meghatározása — a talaj nedvességtartalmának ellenőrzése — eledel
28. nap		— a talaj nedvességtartalmának ellenőrzése — nincs etetés
35. nap		— a talaj nedvességtartalmának ellenőrzése — eledel
42. nap		— a fiatal férgek megszámlálása — a talaj pH-jának és nedvességtartalmának mérése

▼M6

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

39. Bár a 7. függelék rövid áttekintést ad, ebben a vizsgálati módszerben nincs egyértelmű statisztikai iránymutatás megadva a vizsgálati eredmények elemzésére.

40. A dózisbehatároló vizsgálatban a fő végpont a mortalitás. A kifejlett férgek viselkedésében (pl. a talajba való beásásra való képtelenség; mozdulatlan fekvés a vizsgálati edény üvegfala mentén) és morfológiájában (pl. nyílt sebek) mutatkozó elváltozásokat is fel kell azonban jegyezni a fiatal egyedek jelenlétével együtt. Rendszerint probit analízist (21) vagy logisztikus regressziót kell alkalmazni az LC_{50} meghatározására. Olyan esetekben azonban, ahol ez az elemzési módszer nem megfelelő (pl. ha kevesebb, mint három koncentráció áll rendelkezésre részleges pusztulással), alternatív módszereket lehet alkalmazni. Ezek közé a módszerek közé tartoznak a mozgóátlagok (22), a vágott Spearman-Karber módszer (23) vagy az egyszerű interpoláció (pl. az LC_0 és LC_{100} geometriai átlaga az LC_0 négyzetgyöke és az LC_{100} szorzataként számítva).

41. A meghatározó vizsgálatban a végpont a fekunditás (azaz a nemzett fiatal egyedek száma). Ugyanakkor – a dózisbehatároló vizsgálat hoz hasonlóan – minden más káros jelet is fel kell tüntetni a végleges jelentésben. A statisztikai elemzés megköveteli a szaporodás számtani átlagának és szórásának kiszámítását kezelésenként és kontrollonként.

42. Ha varianciaanalízist végeztek, a szórást (s) és a szabadságfokot (df) helyettesíteni lehet az ANOVA-ból nyert összevont varianciabecsléssel és annak szabadságfokával, amennyiben a variancia nem függ a koncentrációtól. Ebben az esetben a kontoll és a kezelések varianciáit kell használni. Ezeket az értékeket általában kereskedelmi statisztikai szoftver segítségével számítják ki, ismétlésként az edényenkénti eredményeket használva. Ha a negatív és oldószeres kontrollok esetében az adatok összevonása tűnik ésszerűnek, nem pedig az egyikükkel szembeni tesztelés, meg kell ezeket a kontrollokat vizsgálni, hogy nem különböznek-e szignifikáns mértékben (a megfelelő teszteket lásd a 45. pontban és a 7. függelékben).

43. A további statisztikai vizsgálatok és következtetések attól függenek, hogy az ismétlések értékei normál eloszlást mutatnak és homogének-e, tekintettel azok varianciájára.

A NOEC becslése

44. A nagy statisztikai erővel bíró teszteket kell előnyben részesíteni. Fel kell használni a korábbi körvizsgálatok során szerzett az tapasztalatokból vagy egyéb történelmi adatokból leszűrt információkat annak megítélésére, hogy az adatok nagyjából normál eloszlásúak-e. A variancia homogenitása (homoszkedaszticitás) sokkal kritikusabb. A tapasztalat azt mutatja, hogy a szórás gyakran együtt növekszik az átlaggal. Ezekben az esetekben az adatok transzformációja vezethet el a homoszkedaszticitáshoz. Az ilyen transzformációnak azonban a vizsgált adatok helyett a történelmi adatokkal kapcsolatos tapasztalatokon kell alapulnia. A homogén adatokkal többféle vizsgálatot kell végezni, például a Williams-féle próbát ($\alpha = 0{,}05$, egyoldalas) (24) (25), vagy bizonyos esetekben a Dunnett-féle próbát (26) (27). Meg kell jegyezni, hogy egyenlőtlen replikáció esetében a táblázat t-értékeit a Dunnett és Williams által javasoltak szerint korrigálni kell. A nagy eltérések miatt időnként a válaszok nem növekednek/csökkennek szabályosan. A monotonitástól való ilyen erős eltérés esetében a Dunnett-féle próba megfelelőbb. Ha a homoszkedaszticitástól való eltérések figyelhetők meg,

▼M6

ésszerű lehet közelebbről megvizsgálni a varianciára gyakorolt lehetséges hatásokat annak eldöntésére, hogy a t-próbákat lehet-e a statisztikai erő nagyobb mértékű elvesztése nélkül alkalmazni (28). Ehelyett többszörös U-próba, például a Holm szerint módosított Bonferroni-féle U-próba (29), vagy ha az adatok heteroszkedaszticitást mutatnak ugyan, de egyébként mögöttes monoton dózis-válasszal jellemezhetők, egy másik nemparaméteres próba [pl. a Jonckheere–Terpstra- (30) (31) vagy a Shirley- (32) (33) próba] is alkalmazható, és általában előnyben kell ezeket részesíteni a nem egyenlő szórásnégyzeteket feltételező t-próbákkal szemben. (lásd még a 7. függelékben található sémát).

45. Ha a határérték-vizsgálat megtörtént, és a paraméteres vizsgálati eljárások előfeltételei (normalitás, homogenitás) teljesülnek, akkor a páros Student-féle t-próbát lehet használni, vagy egyébként a Mann–Whitney-féle U-próbát (29).

Az EC_x becslése

46. Bármely EC_x érték kiszámításához a kezelésenkénti átlagokat használják a regressziós analízishez (lineáris vagy nem lineáris), miután felállították a megfelelő dózis-válasz függvényt. A férgek növekedésének – mint folyamatos válasznak – az EC_x értékei megfelelő regressziós analízis alkalmazásával becsülhetőek (35). A kvantált adatok (mortalitás/túlélés és nemzett utódok száma) leírására alkalmas függvények között van a 2–4 paramétert tartalmazó normális szigmoid, logisztikai vagy Weibull-féle függvény, amelyek közül néhány hormetikus válaszok modellezésére is képes. Ha egy dózis-válasz függvényt lineáris regresszióanalízissel illesztettek, szignifikáns r^2 (determinációs együttható) értéket és/vagy meredekséget kell találni a regresszióanalízissel, mielőtt az EC^x becslésére kerülne sor, amelyet a kontroll átlaga x %-ának megfelelő értéknek a regresszióelemzéssel talált egyenletbe való behelyezésével végeznek el. 95 %-os megbízhatósági határokat Fieller szerint (hivatkozás: Finney (21)) vagy egyéb megfelelő modern módszerek segítségével kell kiszámítani.

47. Alternatív megoldásként a választ a modell paraméter százalékaként vagy arányaként modellezik, amelyet a kontroll átlagos válaszaként értelmeznek. Ezekben az esetekben a normál (logisztikai, Weibull) szigmoid görbe gyakran könnyen illeszthető az eredményekhez a probit regressziós eljárás alkalmazásával (21). Ezekben az esetekben a súlyozó függvényt ki kell igazítani a metrikus válaszokhoz a Christensen által megadottak szerint (36). Ha azonban hormetikus hatást figyeltek meg, a probitanalízist négyparaméteres logisztikai vagy Weibull-függvénnyel kell felváltani, amelyet nem lineáris regressziós eljárással illesztenek (36). Ha az adatokhoz nem illeszthető megfelelő dózis-válasz függvény, alternatív módszereket lehet használni az EC_x és megbízhatósági határai becslésére, mint például a Thompson-féle mozgóátlagokat (22) vagy a vágott Spearman-Karber eljárást (23).

VIZSGÁLATI JEGYZŐKÖNYV

48. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— fizikai jelleg és adott esetben a fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. vízben való oldhatóság, gőznyomás);

— a vizsgált anyag kémiai azonosítása az IUPAC nómenklatúra szerint, CAS-szám, tételszám, szerkezeti képlet és tisztaság;

— a minta lejárati ideje.

A vizsgálathoz felhasznált faj:

— felhasznált kísérleti állatok: faj, tudományos név, beszerzési forrás és tenyésztési körülmények.

Vizsgálati körülmények:

— a mesterséges talaj összetevői és előkészítése;

▼M6

— a vizsgált vegyi anyag alkalmazásának módszere;

— a vizsgálat feltételek leírása, beleértve a hőmérsékletet, nedvességtartalmat, pH-t, stb.;

— a kísérleti terv és eljárások teljes leírása.

Vizsgálati eredmények:

— a kifejlett férgek mortalitási aránya két hét után, valamint a fiatal egyedek száma a dózisbehatároló vizsgálat végén;

— a kifejlett férgek mortalitási aránya három hetes expozíció után, valamint a fiatal egyedek teljes feljegyzése a meghatározó vizsgálat végén;

— a vizsgált szervezetekben megfigyelt fizikai vagy kóros tünetek és viselkedésbeli változások;

— A reprodukciós LC_{50}, NOEC és/vagy EC_x (pl. EC_{50}, EC_{10}) érték, adott esetben konfidenciaintervallumokkal, a kiszámítására használt illesztett modell grafikonja, valamint minden olyan információ és megfigyelés, amely segítséget nyújthat az eredmények értelmezéséhez.

Az e vizsgálati módszerben leírt eljárásoktól való eltérések és a vizsgálat során bekövetkezett valamennyi szokatlan esemény.

IRODALOM

(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) E melléklet C.8. fejezete: Földigilisztákra kifejtett toxicitás.

(6) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1993). Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földigilisztákra (*Eisenia fetida*). 1. rész: Az akut toxicitás meghatározása mesterséges talaj használatával, No. 11268-1. ISO, Genf.

(7) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1996). Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földigilisztákra (*Eisenia fetida*). 2. rész: A szaporodásra gyakorolt hatások meghatározása, No. 11268-2. ISO, Genf.

(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 (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1994). Talajminőség. A pH meghatározása, No. 10390. ISO, Genf.

(17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902, 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 comparisons procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(27) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

(29) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

▼**M6**

(33) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(34) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

(35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(36) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

1. függelék

Fogalommeghatározások

E vizsgálati módszer alkalmazásában a következő fogalommeghatározások alkalmazandók:

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

EC_x (hatáskoncentráció x % hatás eléréséhez): az a koncentráció, amely valamely hatás x %-át okozza a vizsgálati szervezetekben egy adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva. Ebben a vizsgálatban a hatáskoncentrációk a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában vannak kifejezve.

LC_0 (nem letális koncentráció): a vizsgált anyag azon koncentrációja, amely nem pusztítja el a kitett vizsgált szervezeteket egy adott időtartamon belül. Ebben a vizsgálatban a LC_0 értékét a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában fejezik ki.

LC_{50} (közepesen letális koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon koncentrációja, amely a kitett vizsgált szervezetek 50 %-át elpusztítja egy adott időtartamon belül. Ebben a vizsgálatban a LC_{50} értékét a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában fejezik ki.

LC_{100} (teljesen letális koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon koncentrációja, amely a kitett vizsgált szervezetek 100 %-át elpusztítja egy adott időtartamon belül. Ebben a vizsgálatban a LC_{100} értékét a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában fejezik ki.

LOEC (észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon legalacsonyabb koncentrációja, amelynek még statisztikailag szignifikáns hatása van ($p < 0,05$). Ebben a vizsgálatban a LOEC értékét a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában fejezik ki. A LOEC értékét meghaladó valamennyi vizsgálati koncentrációnak rendszerint olyan hatást kell mutatnia, amely statisztikailag különbözik a kontroll hatásától. A LOEC fenti meghatározása tekintetében megállapítható bárminemű eltérést indokolni kell a vizsgálati jelentésben.

NOEC (észlelhető hatást még nem okozó koncentráció): a vizsgált vegyi anyag közvetlenül a LOEC alatt elhelyezkedő azon legmagasabb koncentrációja, amelyen nem figyelhető meg hatás. Ebben a vizsgálatban a NOEC-nek megfelelő koncentrációnak nincs statisztikailag szignifikáns hatása ($p > 0,05$) az adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva.

Szaporodási sebesség: az előállított fiatal férgek átlagos számának és a felnőtt egyedek számának hányadosa a vizsgálati időszakban.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼M6

2. függelék

A maximális víztartó képesség meghatározása

A mesterséges talaj víztartó képességének meghatározása

A következő módszert találták megfelelőnek. Leírása az ISO DIS 11268-2 C. mellékletében található.

Gyűjtsön össze meghatározott mennyiségű (pl. 5 g) vizsgálati táptalajt alkalmas eszköz (csigás cső, stb) segítségével. Fedje le a cső alját egy darab szűrőpapírral, és – miután megtöltötte vízzel – tegye egy vízfürdőben elhelyezett állványra. A csövet fokozatosan víz alá kell meríteni addig, amíg a víz szintje a talaj teteje fölé nem emelkedik. Ezután a csövet a vízben kell hagyni körülbelül három órán keresztül. Mivel nem lehet a talaj hajszálereibe felszívódott minden vizet benntartani, a talajmintát hagyni kell lecsepegni két órá keresztül úgy, hogy a csövet nagyon vizes finomra őrölt kvarchomokból készített ágyra kell helyezni egy zárt edényben (hogy ne száradjon ki). Az ezután 105 °C-on tömegállandóságig szárított mintát meg kell mérni. A víztartó képességet (WHC) a következők szerint kell kiszámítani:

$$\text{WHC (a száraz tömeg \% – ában)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Ahol:

S = a vízzel telített szubsztrátum + a cső tömege + a szűrőpapír tömege

T = tára (cső tömege + szűrőpapír tömege)

D = a szubsztrátum száraz tömege

HIVATKOZÁSOK:

ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1996). Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földigilisztára (Eisenia fetida). 2. rész: A szaporodásra gyakorolt hatások meghatározása, No. 11268-2. ISO, Genf.

▼**M6**

3. függelék

A talaj pH-értékének meghatározása

A talajminták pH-értékének meghatározására szolgáló következő módszer az ISO 10390 (Talajminőség. A pH meghatározása) szabványban található leíráson alapul.

A meghatározott mennyiségű talajt szobahőmérsékleten szárítják legalább 12 órán keresztül. Ezután talajszuszpenziót (amely legalább 5 gramm talajt tartalmaz) készítenek ötszörös térfogatú 1 mólos analitikai tisztaságú kálium-klorid (KCl) oldattal vagy 0,01 mólos analitikai tisztaságú kalcium-klorid ($CaCl_2$) oldattal. A szuszpenziót ezután öt percig alaposan összerázzák. A rázás után a szuszpenziót legalább 2 órán át állni hagyják, de nem tovább, mint 24 órán át. Ezután megmérik a folyékony fázis pH-ját pH-mérővel, amelyet minden mérés előtt pufferoldatok megfelelő sorozatával (például pH = 4,0 és 7,0) kalibrálnak.

HIVATKOZÁSOK:

ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1994). Talajminőség. A pH meghatározása, No. 10390. ISO, Genf.

▼M6

4. függelék

Az enchytraeus fajok tenyésztési körülményei

Az *Enchytraeus albidus* fajba (valamint más *Enchytraeus fajokba*) tartozó televényférgeket nagy (pl. 30 × 60 × 10 cm-es) műanyag dobozokban lehet tenyészteni, amelyek mesterséges talaj és természetes, fertőzésmentes kerti talaj 1:1 arányú keverékével vannak megtöltve. A komposzt kerülendő, mivel toxikus vegyi anyagokat, például nehézfémeket tartalmazhat. Használat előtt a faunát el kell távolítani a talajból (pl. mélyfagyasztással). Csak mesterséges talajt tartalmazó szubsztrátum is használható, de a reprodukciós sebesség alacsonyabb lehet, mint a kevert talajt tartalmazó szubsztrátum esetében. A tenyésztésre használt szubsztrátum pH-ja 6,0 ± 0,5 legyen.

A tenyészetet sötétben kell tárolni 15-20 °C ± 2 °C hőmérsékleten. A 23 °C-ot meghaladó hőmérsékletek kerülendők. A talajt nyirkos, de nem nedves állapotban kell tartani. A talaj helyes nedvességtartalmát az jelzi, ha a talaj enyhe nyomásra kis vízcseppek jelennek meg az ujjaink között. Az oxigénhiányos körülményeket el kell kerülni, ezért gondoskodni kell arról, hogy a tenyészedények fedele lehetővé tegye a megfelelő gázcserét a légkörrel. A talajt minden héten gondosan fel kell törni a szellőzés megkönnyítése céljából.

A férgeket zabpehellyel lehet etetni. A zabpelyhet légmentesen zárt edényekben kell tárolni és használat előtt autoklávban kezelni, vagy felmelegíteni a lisztatka (például *Glyzyphagus sp.*, *Astigmata*, *Acarina*) vagy ragadozó atka (például Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles, *Gamasida*, *Acarina*) fertőzés elkerülése végett. A hőkezelést követően az eledelt meg kell őrölni úgy, hogy az könnyen szétszórható legyen a talaj felszínén. Időről időre a zabpelyhet is ki lehet egészíteni vitaminok, tej és tőkehalmáj-olaj hozzáadásával. Más alkalmas eledelek az élesztő és a „Tetramin” haleledel.

Etetésre körülbelül hetente kétszer kerül sor. Megfelelő mennyiségű zabpelyhet szórnak szét a talaj felszínén vagy kevernek bele óvatosan a szubsztrátumba, amikor a talajt a szellőzés megkönnyítése céljából feltörik. Az adott eledel abszolút mennyisége függ a szubsztrátumban jelen lévő férgek számától. Iránymutatásként, az eledel mennyiségét növelni kell, ha azt a beadástól számított egy napon belül a férgek maradéktalanul elfogyasztják. Ezzel szemben, ha a második etetés idején (egy héttel később) még maradt a korábbi eledelből a talaj felszínen, az adagot csökkenteni kell. A gombákkal szennyezett eledelt el kell távolítani és ki kell cserélni. Három hónap után a férgeket át kell helyezni frissen készített szubsztrátumba.

A tenyésztési körülményeket kielégítőnek lehet tekinteni, ha a férgek: a) nem próbálják meg elhagyni a táptalajt, b) gyorsan mozognak a talajon keresztül, c) fényes testfelületűek hozzátapadt talajrészecskék nélkül, d) többé-kevésbé fehéres színűek, e) különböző korosztályok figyelhetők meg a kultúrákban és f) folyamatosan szaporodnak.

▼M6

5. függelék

A vizsgálat elvégzése más enchytraeus fajokkal

A fajok kiválasztása

Az *E. albidustól* eltérő fajok is használhatók, de a vizsgálati eljárást és az érvényességi kritériumokat ennek megfelelően hozzá kell igazítani. Mivel sok *Enchytraeus*-faj áll rendelkezésre, amelyet laboratóriumban kielégítően fenn lehet tartani, az *E. albidustól* eltérő fajok legfontosabb kiválasztási kritériuma az ökológiai relevancia és ezenkívül az összehasonlítható érzékenység. Formális oka is lehet más faj választásának. Például azokban az országokban, ahol az *E. albidus* nem fordul elő és importálni sem lehet (pl. karantén miatt), más *Enchytraeus* fajt kell használni.

Példák az alkalmas alternatív fajokra

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992): Az utóbbi években ezt a fajt a tenyésztés és a vizsgálat egyszerűsége miatt gyakran használták ökotoxikológiai vizsgálatok céljára. Azonban ez a faj kis testméretű, és ez a tény az *E. albidus* fajnál sokkal nehezebbé teszi a kezelését (különösen a festési módszer használata előtti fázisokban). Az *E. crypticus* fajról nem állapították meg teljes bizonyossággal, hogy jelen van a terepen, mivel csak földigiliszta-kultúrákban írták le. Az erre a fajra vonatkozó ökológiai követelményeknek ezért nem ismertek.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Ez a név valószínűleg közeli rokonságban álló fajok egész csoportjára vonatkozik, amelyek morfológiailag nehezen megkülönböztethetők. A vizsgálatokban történő használata nem javasolt, amíg a vizsgálatban használt egyedeket nem lehet egyetlen fajként azonosítani. Az *E. buchholzi* általában megtalálható réteken és bolygatott helyeken, illetve utak mentén.

— *Enchytraeus luxuriosus*: Ez a faj eredetileg *E.* „*minutus*”, néven volt ismert, de a közelmúltban pontosan leírták (1). Először U. Graefe (Hamburg) találta meg egy réten, St. Peter-Ording közelében (Schleswig-Holstein, Németország). Az *E. luxuriosus* körülbelül fele akkora, mint az *E. albidus*, de nagyobb, mint a többi itt tárgyalt faj; ez az *E. albidus* jó alternatívájává teszi.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen 1963): Erről a fajról eddig német és spanyol ásványi talajokon számoltak be, ahol gyakran, de általában nem túl nagy számban fordul elő. Az e nembe tartozó más kisméretű fajokkal összehasonlítva viszonylag könnyen azonosítható. Semmit nem tudunk a laboratóriumi vizsgálatokban való viselkedéséről és a vegyi anyagokkal szembeni érzékenységéről. Azt azonban megállapították, hogy könnyen tenyészthető (E. Belotti, személyes közlés).

Tenyésztési körülmények

Az összes fentebb említett *Enchytraeus* faj tenyészthető az *E. albidus* esetében használt szubsztrátumban. Kisebb méretük azzal jár, hogy a tenyésztőedények kisebbek lehetnek, és – bár ugyanazt az eledelt lehet használni – az adag méretét be kell állítani. E fajok életciklusa rövidebb, mint az *E. albidus* életciklusa, és gyakrabban kell etetni őket.

Vizsgálati körülmények

A vizsgálati körülmények általában megegyeznek az *E. albidusra* vonatkozó körülményekkel, kivéve, hogy:

— a vizsgálati tartályok mérete kisebb lehet (de ez nem szükségszerű);

— a reprodukciós vizsgálat időtartama rövidebb lehet (de ez nem szükségszerű), azaz hat hét helyett négy hét; a dózisbehatároló vizsgálat időtartamán azonban nem kell változtatni;

— tekintettel a fiatal férgek kis méretére, kifejezetten ajánlott festési módszert használni a számláláshoz;

— a „kontroll vizsgálati edényenkénti fiatal egyedek számával” kapcsolatos érvényességi feltételt „50”-re kell változtatni.

▼**M6**

HIVATKOZÁSOK

(1) Schmelz, R.M. and Collado, R. (1999). Enchytraeus luxuriosus sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). Carolinea 57, 93-100.

▼M6

6. függelék

Az extrakciós technikák részletes ismertetése

Bengálvörös festés

Ennek az eredetileg a limnikus ökológiában kifejlesztett módszernek (1) a fiatal televényférgek Enchytraeidae reprodukciós vizsgálat keretében történő megszámlálására való alkalmazását először W. de Coen (University of Ghent, Belgium) javasolta. Ettől függetlenül RIVM Bilthoven a módszer egy módosított változatát fejlesztette ki, amelyben a bengálvöröst etanol helyett formaldehiddel keverik (2) (3).

A meghatározó vizsgálat végén (azaz hat hét után) a vizsgálati edényekben található talajt átvisszük egy lapos edénybe. Erre a célra alkalmas egy Bellaplast-edény vagy egy bordázott aljú fotótál; ez utóbbi azért, mert a „bordák” a megfigyelési területen belülre korlátozzák a férgek mozgását. A fiatal egyedeket etanollal rögzítik (kb. 5 ml ismétlésenként). Az edényeket ezután vízzel feltöltik úgy, hogy a víz legfeljebb 1-2 cm-es réteget képezzen. Néhány csepp (200-300 μl) bengálvörös festéket (1 %-os etanolos oldat) adnak hozzá (vagy alternatív megoldásként 0,5 % eozint), és a két komponenst gondosan összekeverik. 12 óra múlva a férgeknek vöröses színnel meg kell festődniük és könnyű őket megszámolni, mert a szubsztrátum felületén fognak feküdni. Alternatív módszerként a férgek megszámlálása előtt a szubsztrátum/alkohol elegyet át lehet mosni egy szitán (hálóméret: 0,250 mm). Ezzel az eljárással a kaolinit, a tőzeg, valamint a homok egy része ki fog mosódni, és ezáltal a vöröses színű férgek jobban láthatók lesznek és könnyebb lesz őket megszámolni. Megvilágított lencsék (az objektív mérete legalább 100 × 75 mm, a nagyítás 2–3x) használata is megkönnyíti a számolást.

A festési technika edényenként néhány percre csökkenti a számolásra fordítandó időt, és iránymutatásként lehetővé kell tenni, hogy egy ember értékelje az egy vizsgálatból származó összes edényt legfeljebb két napon belül.

Nedves extrakció

A nedves extrakciót a vizsgálat végeztével azonnal meg kell kezdeni. A talajt az edényekből műanyag szitákra helyezik, amelyek hálómérete körülbelül 1 mm. A szitákat ezután egy műanyag tálakban felfüggesztettik, anélkül, hogy a sziták a tálak alját érintenék. A tálakat gondosan feltöltik vízzel, amíg a szitákon lévő minták teljesen a víz felszíne alá nem kerülnek. A jelenlévő férgek 90 %-ot meghaladó kinyerési aránya érdekében 3 napos extrakciós időtartamot kell használni 20 ± 2 °C-on. Az extrakciós időtartam végén a szitákat eltávolítják, és a vizet (egy kis mennyiség kivételével) lassan elöntik, ügyelve arra, hogy ne zavarják a tálak alján található üledéket. A műanyag tálakat egy kicsit megrázzák, hogy az üledéket a felette lévő vízben szuszpendálják. A vizet átviszik egy Petri-csészébe, és – miután a talajrészecskék leülepedtek – a televényférgeket be lehet azonosítani, majd lágy acél csipesszel el lehet távolítani és sztereomikroszkóp segítségével meg lehet számolni.

Lebegés

A lebegésen alapuló módszert R. Kuperman írta le egy feljegyzésben (4). A vizsgálati edény tartalmának etanollal történő fixálása után a talajt elárasztják Ludoxszal (AM-30 kolloid szilícium-dioxid, 30 tömegszázalékos vizes szuszpenzió), amíg a talaj felszínét legfeljebb 10 és 15 mm-rel elfedi. Miután a talajt a flotációs anyaggal 2-3 percig alaposan elkeverték, a víz felszínén lebegő fiatal férgeket könnyen meg lehet számolni.

Hivatkozások

(1) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

▼**M6**

(2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

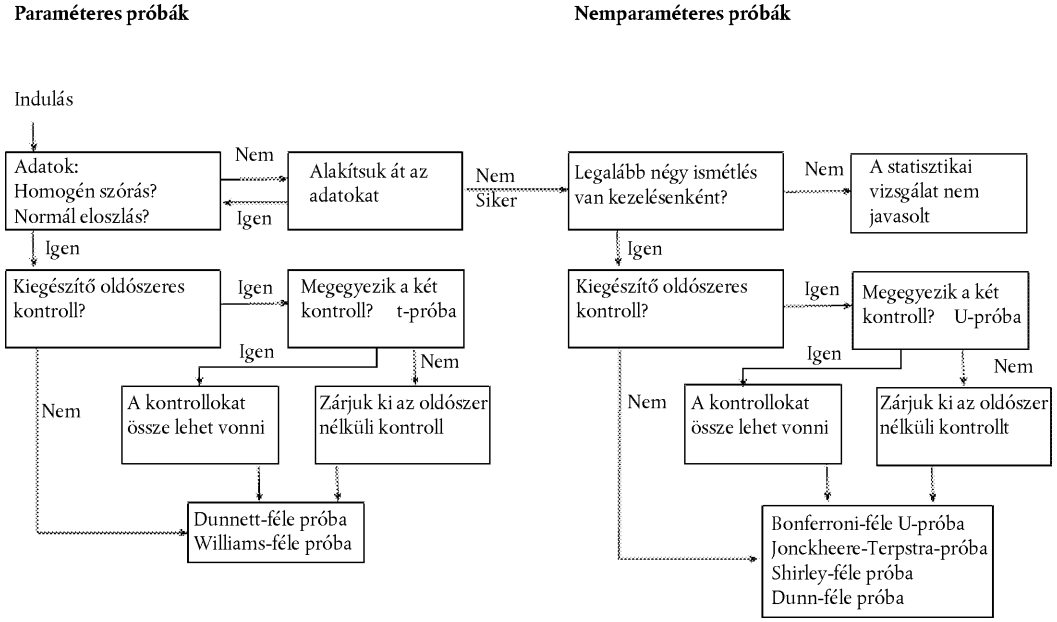
(3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. and Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, 108-121.

(4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. and Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, p. 157.

▼**M6**

7. függelék

Az adatok statisztikai értékelésének áttekintése (a NOEC meghatározása)



▼M6

C.33. FÖLDIGILISZTÁK SZAPORODÁSÁNAK VIZSGÁLATA (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI*)

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 222. vizsgálati iránymutatásában (2004) leírt módszerrel. A vizsgálatot a talajban lévő vegyi anyagoknak az *Eisenia fetida* (Savigny 1826) vagy az *Eisenia andrei* (Andre 1963) földigiliszta faj reprodukciós teljesítményére (és egyéb szubletális végpontokra) gyakorolt hatásainak értékelésére tervezték (1) (2). A vizsgálatot körvizsgálattal ellenőrizték (3). Létezik egy vizsgálati módszer a földigiliszták akut toxicitási vizsgálatára (4). Számos egyéb nemzetközi és nemzeti iránymutatást tettek közzé a földigiliszták akut és krónikus vizsgálatára (5) (6) (7) (8).

2. Az *Eisenia fetida/Eisenia andrei* fajokat a talajfauna és különösen a földigiliszták tekintetében reprezentatív fajnak tekintik. A földigiliszták ökológiájára és ökotoxikológiai vizsgálatokban való használatukra vonatkozóan rendelkezésre állnak bizonyos háttérinformációk (7) (9) (10) (11) (12).

A VIZSGÁLAT ELVE

3. Kifejlett férgeket teszünk ki a vizsgált vegyi anyag talajba kevert vagy – növényvédő szerek esetében – a vegyi anyag jellemző felhasználási módját tükröző eljárással a talajba bevitt vagy annak felszínére juttatott koncentrációsorozatának. A vegyi anyag bejuttatásának módja a vizsgálat céljától függ. A vizsgált koncentrációtartományt úgy választjuk ki, hogy az magában foglalja azokat a koncentrációkat, amelyek nyolc hét alatt várhatóan szubletális és letális hatásokat egyaránt okoznak. A kifejlett férgek mortalitási arányára és növekedésére gyakorolt hatásokat 4 hetes expozíció után határozzuk meg. A kifejlett férgeket ezután eltávolítják a talajból, és a szaporodásra gyakorolt hatásokat további 4 hét elteltével értékeljük a talajban jelen lévő utódok megszámlálásával. A vizsgált vegyi anyagnak kitett férgek reprodukciós teljesítményét összehasonlítjuk a kontrollcsoporttal (vagy csoportokkal) i. az észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC) és/vagy ii. az EC_x (például EC_{10}, EC_{50}) meghatározása érdekében; ez utóbbinál regressziós modell segítségével becsüljük meg azt a koncentrációt, amely x %-kal csökkenti a reprodukciós teljesítményt. Az EC_x (például EC_{10}, EC_{50}) értékének a vizsgálati koncentrációk által meghatározott tartományon belül kell elhelyezkednie annak érdekében, hogy az EC_x értékét extrapoláció helyett interpolációval lehessen meghatározni (a fogalommeghatározásokat lásd az 1. függelékben).

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

4. Rendelkezésre kell állnia a vizsgált vegyi anyagra vonatkozó alábbi információknak, amelyek segítik a megfelelő vizsgálati eljárások kidolgozását:

   — vízoldékonyság;

   — log K_{ow};

   — gőznyomás;

   — valamint a vizsgált vegyi anyag környezeti sorsára és környezetben való viselkedésére vonatkozó információk, ahol lehetséges (pl. a fotolízis és a hidrolízis sebessége, ha a jellemző felhasználási mód miatt indokolt).

5. Ez a vizsgálati módszer minden vegyi anyag esetében alkalmazható, függetlenül annak vízoldhatóságától. A vizsgálati módszer nem alkalmazható illékony vegyi anyagok esetében, azaz olyan vegyi anyagoknál, amelyek Henry-féle állandója vagy levegő-víz megoszlási hányadosa nagyobb, mint egy, illetve olyan vegyi anyagok esetében, amelyek gőznyomása 25 °C-on meghaladja a 0,0133 Pa értéket.

6. E vizsgálati módszer nem számol a vizsgált vegyi anyag lehetséges lebomlásával a vizsgálati időszak során. Következésképpen nem lehet azt feltételezni, hogy az expozíciós koncentrációk kezdeti értékükön maradnak a vizsgálat során. Ebben az esetben a vizsgált vegyi anyag kémiai elemzése ajánlott a vizsgálat elején és végén.

▼M6

REFERENCIA-VEGYIANYAG

7. Meg kell határozni egy referencia-vegyianyag NOEC és/vagy EC_x értékét a megfelelő laboratóriumi vizsgálati körülmények garantálása érdekében, illetve annak ellenőrzésére, hogy a vizsgált szervezetek által adott válasz az idő múlásával statisztikailag nem változik. Referencia-vegyianyaggal legalább évente egyszer (vagy ha ennél ritkábban végzünk vizsgálatot, akkor a vizsgált vegyi anyag toxicitásának meghatározásával párhuzamosan mindig) ajánlott vizsgálatot végezni. A karbendazim vagy a benomil alkalmas referencia-vegyianyagok, amelyeknek reprodukciót befolyásoló hatását kimutatták (3). Jelentős hatásokat kell megállapítani a) 1–5 mg hatóanyag (a.i.)/kg száraz tömeg vagy b) 250–500 g/ha vagy 25–50 mg/m^2 esetén. Amennyiben a vizsgálatsorozat pozitív toxikus standardot is tartalmaz, egyetlen koncentrációt kell alkalmazni, és az ismétlések számának meg kell egyeznie a kontrollok esetében használt ismétlésszámmal.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

8. A kontrolloknak a következő kritériumoknak kell megfelelniük a vizsgálati eredmény érvényességéhez:

— minden ismétlésben (amely 10 kifejlett egyedet tartalmaz) ≥ 30 fiatal egyedet kell nemzeni a vizsgálat végéig;

— a reprodukció relatív szórásának ≤ 30 %-nak kell lennie;

— a kifejlett egyedek mortalitási arányának a vizsgálat első 4 hetében≤ 10 %-nak kell lennie.

Ha a vizsgálati nem felel meg a fenti érvényességi kritériumoknak, a vizsgálatot abba kell hagyni, kivéve, ha a vizsgálat folytatása megfelelően indokolható. Az indoklást szerepeltetni kell a jegyzőkönyvben.

A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

Berendezések

9. Üvegből vagy más, kémiailag semleges anyagból készült, körülbelül 1–2 liter kapacitású vizsgálati edényeket kell használni. Az edények keresztmetszeti területének körülbelül 200 cm^2-nek kell lennie, hogy 500–600 g száraz tömegű szubsztrátum edénybe töltésével körülbelül 5–6 cm mélységű nedves szubsztrátumréteg legyen elérhető. Az edényt úgy kell kialakítani, hogy ne akadályozza a szubsztrátum és a légkör közötti gázcserét, valamint a fény bejutását (pl. perforált átlátszó fedéllel), de a férgek ne tudjanak kiszökni belőle. Ha a vizsgálati szubsztrátum mennyisége lényegesen meghaladja az 500–600 grammot edényenként, a férgek számát arányosan növelni kell.

10. Általános laboratóriumi felszerelés, így különösen a következők szükségesek:

— szárítószekrény;

— sztereomikroszkóp;

— pH-mérő és fotométer;

— megfelelő pontos mérlegek;

— megfelelő hőmérséklet-szabályozó eszközök;

— megfelelő páratartalom-szabályozó eszközök (nem szükséges, ha az expozíciós edényeknek van fedele);

— inkubátor vagy kis helyiség klímaberendezéssel;

— csipeszek, horgok vagy hurkok;

— vízfürdő.

▼M6

A mesterséges talaj előkészítése

11. E vizsgálatban mesterséges talajt használunk (5) (7), amelynek összetétele a következő (száraz tömegek alapján, 105 °C-on állandó tömegig szárítva):

— 10 % tőzegmoha (a lehető legközelebb a pH 5,5–6,0 értékhez, látható növényi maradványok nélkül, finomra őrölve, mért nedvességtartalomig szárítva);

— 20 % kaolinagyag (lehetőleg 30 % feletti kaolinittartalommal);

— 0,3–1,0 % kalcium-karbonát ($CaCO_3$, porított, analitikai tisztaságú) a 6,0 ± 0,5 kiindulási pH-érték eléréséhez.

— körülbelül 70 % levegőn szárított kvarchomok (a $CaCO_3$ szükséges mennyiségétől függően), túlnyomórészt finom homok, a részecskék legalább 50 %-a 50–200 mikron között legyen.

1. megjegyzés: A $CaCO_3$ szükséges mennyisége a talajszubsztrátum komponenseitől függ, beleértve az eledelt is, és közvetlenül a vizsgálat előtt talaj alminták mérésével kell meghatározni. A pH-t vegyes mintában mérik 1 mólos kálium-klorid (KCl) vagy egy 0,01 mólos kalcium-klorid ($CaCl_2$) oldatban (13).

2. megjegyzés: A mesterséges talaj szerves széntartalmát csökkenteni lehet, pl. a tőzegtartalom 4-5 %-ra való csökkentésével és a homoktartalom megfelelő növelésével. A szerves széntartalom csökkentése esetén kisebb a lehetősége a vizsgált vegyi anyag talajon (szerves szénen) való adszorbeálódásának, miközben a vizsgált vegyi anyag hozzáférhetősége a férgek számára javul. Kimutatták, hogy az alacsonyabb – például 2,7 % (14) – szerves széntartalmú természetes talajokban vizsgált Eisenia fetida esetében a szaporodással kapcsolatos érvényességi kritériumok teljesülnek, és a tapasztalatok szerint ez az 5 %-os tőzegtartalommal rendelkező mesterséges talajjal is elérhető. Ezért az ilyen talajok meghatározó vizsgálatban történő használata előtt nem szükséges demonstrálni azt, hogy a mesterséges talaj lehetővé tudja tenni az érvényességi kritériumoknak való megfelelést, kivéve, ha a tőzegtartalom a fent meghatározottnál nagyobb mértékben csökken.

3. megjegyzés: Ha a további (pl. magasabb szintű) vizsgálatok során természetes talajt használnak, a talaj alkalmasságát és a vizsgálat érvényességi feltételeinek elérését is demonstrálni kell.

12. A talaj száraz összetevőit megfelelő szellőzésű helyen alaposan összekeverik (például nagyüzemi méretű laboratóriumi keverőgéppel). A vizsgálat megkezdése előtt a száraz mesterséges talajt előnedvesíteni kell annyi deionizált víz hozzáadásával, hogy a végső víztartalomnak – amely a maximális víztartó képesség 40–60 %-a (amely 50 ± 10 % víztartalomnak felel meg a száraz tömegre vetítve) – körülbelül felét lehessen elérni. Ez olyan szubsztrátumot eredményez, amelyben kézzel való összenyomás hatására nem mutatkozik álló vagy szabad víz. A mesterséges talaj maximális víztartó képességét (WHC) a 2. függelékében, az ISO 11274 (15) szabványban vagy az azzal egyenértékű EU-szabványban leírt eljárásokkal összhangban kell meghatározni.

13. Ha a vizsgált vegyi anyagot a talaj felületén vagy víz nélkül a talajba keverve alkalmazzák, a víz végső mennyiségét lehet a mesterséges talajba keverni a talaj elkészítése során. Ha a vizsgált vegyi anyagot kevés vízzel keverik a talajba, a többlet vizet együtt lehet adni a vizsgált vegyi anyaggal (lásd a 19. pontot).

14. A talaj nedvességtartalmát a vizsgálat elején és végén az ISO 11465 (16) szabványnak vagy azzal egyenértékű EU-szabványnak megfelelően, a talaj pH értékét pedig a 3. függelék, az ISO 10390 (13) szabvány vagy azzal egyenértékű EU-szabvány szerint határozzák meg. Ezeket a meghatározásokat a kontroll talaj egy mintájában, illetve minden egyes vizsgálati koncentráció

▼M6

talajmintájában is el kell végezni. A talaj pH-értéke nem módosítható, ha savas vagy lúgos vegyi anyagot tesztelnek. A nedvességtartalmat az egész vizsgálat során ellenőrizni kell az edények időközönként történő mérlegelése útján (lásd a 26. és 30. pontot).

A vizsgálati állatok kiválasztása és előkészítése

15. A vizsgálatban használt faj az Eisenia fetida vagy az Eisenia andrei (1) (2). A vizsgálat elindításához kifejlett, két hónap és egy év közötti korú, clitellummal rendelkező férgekre van szükség. A férgeket egy viszonylag homogén korstruktúrájú, szinkronizált kultúrából kell kiválasztani (4. függelék). Az egy vizsgálati csoportba tartozó egyedek életkora között nem lehet 4 hétnél nagyobb különbség.

16. A kiválasztott férgeket legalább egy napig szoktatni kell a vizsgálathoz használt mesterséges talajszubsztrátum típusához. Ebben az időszakban a férgeket ugyanazzal az eledellel kell etetni, mint amelyet a vizsgálathoz fognak használni (lásd a 31–33. pontot).

17. A vizsgálat elején 10 féregből álló csoportokat kell egyénileg lemérni, majd a csoportokat véletlenszerűen hozzárendelni a vizsgálati edényekhez. A férgeket a mérés előtt lemossák (ionmentesített vízzel), majd a felesleges vizet a férgek rövid időre szűrőpapírra helyezésével eltávolítják. Az egyes férgek nedves tömegének 250 és 600 mg között kell lennie.

A vizsgálati koncentrációk előkészítése

18. A vizsgált vegyi anyag alkalmazásának két módszere használható: a vizsgált vegyi anyag bekeverése a talajba (lásd a 19–21. pontot), vagy a talaj felületén történő alkalmazás (lásd a 22–24. pontot). A megfelelő módszer kiválasztása a vizsgálat céljától függ. Általánosságban a vizsgált anyag a talajba való bekeverése ajánlott. Olyan alkalmazási eljárásokra lehet azonban szükség, amelyek összhangban vannak a hagyományos mezőgazdasági gyakorlattal (például a folyékony készítmény permetezése vagy speciális növényvédőszer készítmények alkalmazása, mint például a granulátumok vagy csávázószerek). A talajnak a vizsgált vegyi anyaggal való kezelését elősegítő oldószerek kiválasztásakor a földigilisztákra gyakorolt csekély toxicitásból kell kiindulni, és a vizsgálati elrendezésnek megfelelő oldószerkontrollt is tartalmaznia kell (lásd a 27. pontot).

A vizsgált vegyi anyag talajba keverése

Vízben oldódó vegyi anyagok

19. A vizsgált vegyi anyagból közvetlenül a vizsgálat megkezdése előtt ionmentesített vízben olyan mennyiségű oldatot kell készíteni, amely egy vizsgálati koncentráció összes ismétléséhez elegendő. Egy társoldószerre lehet szükség, hogy megkönnyítsék a vizsgálati oldat elkészítését. Célszerű akkora mennyiségű oldatot készíteni, amennyi a végső nedvességtartalom (a maximális víztartó képesség 40–60 %-a) eléréséhez szükséges. Az oldatot alaposan összekeverik a talajszubsztrátummal, mielőtt betöltenék azt a vizsgálati edénybe.

Vízben oldhatatlan vegyi anyagok

20. A vizsgált vegyi anyagot megfelelő szerves oldószer (például aceton) kis térfogatában feloldják, majd rápermetezik vagy elkeverik kis mennyiségű finom kvarchomokban. Az oldószert elszívó fülkében legalább néhány percen keresztül történő párologtatással eltávolítják. A kezelt homokot ezután alaposan összekeverik az előnedvesített mesterséges talajjal. Ezután akkora mennyiségű ionmentesített vizet adnak hozzá a talajhoz, amely a maximális víztartó képesség 40–60 %-ának megfelelő a végső nedvességtartalmat eredményez. A talaj ezután készen áll a vizsgálati edényekbe való behelyezésre. Ügyelni kell arra, hogy egyes oldószerek mérgezők lehetnek a földigilisztákra.

▼M6

Vízben oldhatatlan vizsgált vegyi anyagok és szerves oldószerek

21. 10 g finomra őrölt ipari kvarchomokból és a vizsgált vegyi anyag olyan mennyiségéből, amely a vizsgálati koncentráció talajban való eléréséhez szükséges, keveréket készítenek. A keveréket ezután alaposan összekeverik az előnedvesített mesterséges talajjal. Ezután akkora mennyiségű ionmentesített vizet adnak hozzá a talajhoz, amely a maximális víztartó képesség 40–60 %-ának megfelelő a végső nedvességtartalmat eredményez. A talaj ezután készen áll a vizsgálati edényekbe való behelyezésre.

A vizsgált vegyi anyag talajfelszínen történő alkalmazása

22. A talajt a férgek hozzáadása után kezelik. A vizsgálati edényeket először megtöltik nedvesített talajszubsztrátummal, majd a lemért férgeket ráhelyezik a talaj felületére. Az egészséges férgek általában azonnal beássák magukat a szubsztrátumba, következésképpen a 15 perc után a felületen maradt férgeket sérültnek kell tekinteni és ki kell cserélni. Ha a férgeket helyettesítik, az új és a lecserélt férgeket egyaránt meg kell mérni, hogy ismert legyen az expozíciós féregcsoport teljes élősúlya és a férgeket tartalmazó edény teljes súlya a vizsgálat megkezdésekor.

23. A vizsgált vegyi anyagot alkalmazzák. A vizsgált vegyi anyagot nem szabad hozzáadni a talajhoz a férgek elhelyezésétől számított fél órán belül (vagy ha férgek vannak jelen a talaj felszínén), hogy elkerülhető legyen a vizsgált vegyi anyag bőrrel való bármilyen közvetlen érintkezése. Ha a vizsgált vegyi anyag növényvédő szer, helyénvaló lehet azt a talaj felületére való permetezéssel bejuttatni. A vizsgált vegyi anyagot a talaj felszínén lehetőleg egyenletesen kell alkalmazni megfelelő laboratóriumi méretű permetező eszközzel, jelképezve a terepen történő permetezést. Az alkalmazás előtt a vizsgálati edény fedelét el kell távolítani és egy béléssel kell helyettesíteni, amely megvédi az edény oldalfalait a permettől. A bélés készülhet egy vizsgálati edényből, amelynek eltávolították az alját. Az alkalmazást a 20 ± 2 °C szórású hőmérsékleti tartományon belül kell elvégezni, vizes oldatok, emulziók vagy diszperziók esetében 600 és 800 $\mu l/m^2$ közötti vízalkalmazási arányban. Az arányt megfelelő kalibrációs technikával kell hitelesíteni. A különleges készítményeket, mint a granulátumokat vagy csávázószereket, a mezőgazdasági felhasználással megegyező módon kell alkalmazni.

24. A vizsgálati edényeket egy órás időszakra fedetlenül kell hagyni, hogy a vizsgált vegyi anyag alkalmazással kapcsolatos bármely illékony oldószer elpárologhasson. Ügyelni kell arra, hogy ez idő alatt a férgek ne tudjanak elmenekülni a vizsgálati edényekből.

AZ ELJÁRÁS

Vizsgálati csoportok és kontrollok

25. 10 földigiliszta behelyezése ajánlott 500–600 g száraz tömegű mesterséges talajba (azaz 50–60 g talaj férgenként). Ha nagyobb mennyiségű talajt használnak, például amikor különleges alkalmazási módú növényvédő szereket (például csávázószereket) vizsgálnak, a férgenkénti 50–60 g talaj arányt a férgek számának növelésével fenn kell tartani. Tíz férget készítenek elő minden kontroll és kezelt edényhez. A férgeket vízzel lemossák, megtörlik, majd rövid időre nedvszívó papírra helyezik, hogy a felesleges víz elfolyjon.

26. A férgek vizsgálati edényekben való szétosztása során előforduló szisztematikus hibák elkerülése érdekében a vizsgálati populáció homogenitását a vizsgálathoz használt férgek forrásául számító populációból véletlenszerűen kiválasztott 20 féreg tömegének egyénileg történő megmérésével meg kell határozni. A homogenitás ellenőrzése után féregtételeket kell választani, majd ezeket meg kell mérni és randomizálási eljárás segítségével szét kell osztani a vizsgálati edények között. A vizsgálati férgek hozzáadása után a

▼M6

vizsgálati edények tömegét meg kell mérni, hogy rendelkezésre álljon egy kiindulási tömeg, amelyet alapul lehet venni, amikor a vizsgálat során a talaj nedvességtartalmát ellenőrzik a 30. pontban leírtak szerint. A vizsgálati edényeket ezután a 9. pontban leírtaknak megfelelően lefedik, és elhelyezik a vizsgálati kamrában.

27. Megfelelő kontrollokat készítenek a vizsgált vegyi anyag alkalmazására szolgáló, a 18-24. pontban leírt minden módszerhez. A korábban leírt vonatkozó eljárásokat követik a kontrollok elkészítése során is, kivéve, hogy a vizsgált vegyi anyagot nem adják hozzá. Így adott esetben szerves oldószereket, kvarchomokot vagy más hordozókat alkalmaznak a kontrollok esetében is a kezelt csoportoknak megfelelő koncentrációban/mennyiségben. Ha oldószert vagy egyéb hordozót használnak a vizsgált vegyi anyag hozzáadásához, további kontrollt kell készíteni, amely nem tartalmazza a hordozót és a vizsgált vegyi anyagot, és meg kell vizsgálni, hogy a hordozó befolyásolja-e az eredményt.

Vizsgálati körülmények

28. A vizsgálati hőmérséklet 20 ± 2 °C. A vizsgálatot ellenőrzött világos-sötét ciklusok szerint végzik (lehetőleg 16 óra világos és 8 óra sötét), 400–800 lux megvilágítással a vizsgálati edények területén.

29. A vizsgálati edényeket nem levegőztetik a vizsgálat során, de a vizsgálati edények fedeleinek kialakítása lehetőséget kell biztosítson a gázcserére, korlátozva ugyanakkor a nedvesség elpárolgását (lásd a 9. pontot).

30. A táptalajt víztartalmát a vizsgálati edényekben az egész vizsgálat alatt úgy tartják fenn, hogy rendszeres időközönként újra lemérik a vizsgálati edényeket (fedelek nélkül). A veszteségeket szükség esetén desztillált vízzel pótolják. A víztartalom nem változhat 10 %-nál nagyobb mértékben a vizsgálat kezdetekor mért értékhez viszonyítva.

Táplálás

31. Bármilyen eledelt, amelyről kimutatták, hogy alkalmas a férgek tömegének legalább szinten tartására a vizsgálat alatt, elfogadhatónak tekintenek. A tapasztalat azt mutatja, hogy a zabpehely, a tehén- vagy lótrágya megfelelő eledel. Ellenőrizni kell, hogy a teheneket vagy lovakat, amelyek a trágyát biztosítják, nem kezelik vegyi anyagokkal, például hozamfokozókkal, nematicidekkel vagy hasonló állatgyógyászati készítményekkel, amelyek hátrányosan érinthetnék a férgeket a vizsgálat során. A saját gyűjtésű tehéntrágya használata ajánlott, mert a tapasztalat azt mutatja, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható, kerti trágyaként használt tehéntrágya káros hatással lehet a férgekre. A trágyát levegőn meg kell szárítani, finomra kell őrölni és pasztőrözni kell használat előtt.

32. Az eledel minden friss tételét a vizsgálatban történő felhasználás előtt először egy nem vizsgált féregkultúrával kell etetni, hogy meg lehessen győződni az adott tétel megfelelő minőségéről. A férgek növekedése és a bábok termelése nem csökkenhet az eledel új tételét nem tartalmazó szubsztrátumban tartott férgekhez képest (a C.8 vizsgálati módszerben ismertetett feltételek (4)).

33. Eledelt először egy nappal a férgek hozzáadása és a vizsgált vegyi anyagnak a talajon való alkalmazása után adnak. Körülbelül 5 g eledelt szétterítenek az edényekben lévő talaj felszínén és ionmentesített vízzel megnedvesítik (körülbelül 5–6 ml vízzel edényenként). Ezt követően hetente egyszer adnak eledelt a férgeknek a 4 hetes vizsgálati időszak alatt. Ha el nem fogyasztott

▼M6

eledel marad vissza, a fejadagot csökkenteni kell, hogy elkerüljék a gombák szaporodását vagy a penészedést. A kifejlett egyedeket a vizsgálat 28. napján eltávolítják a talajból. Ezután további 5 g eledelt adnak minden vizsgálati edényhez. A vizsgálat hátralévő 4 hetében további etetésre nem kerül sor.

A vizsgálati koncentrációk kiválasztása

34. A vizsgált vegyi anyag toxicitásának előzetes ismerete segít a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásában, pl. egy akut vizsgálatból (4) és/vagy dózisbehatároló vizsgálatokból. Ha szükséges, dózisbehatároló vizsgálatot kell végezni, például öt vizsgálati koncentrációval: 0,1, 1,0, 10, 100, és 1 000 mg/kg (talaj száraz tömeg). Kezelésenként és kontrollonként egy ismétlés elegendő. A dózisbehatároló vizsgálat időtartama két hét, a mortalitást a vizsgálat végén értékelik.

Kísérleti elrendezés

35. Mivel egyetlen összefoglaló statisztika nem írható elő a vizsgálathoz, ez a vizsgálati módszer a NOEC és az EC_x meghatározásáról rendelkezik. A NOEC alkalmazását a szabályozó hatóságok a belátható jövőben valószínűleg meg fogják követelni. A közeljövőben – statisztikai és ökológiai szempontok miatt – elfogadhatják az EC_x szélesebb körű használatát. Ezért egy televényférgek szaporodására alpuló vizsgálati módszer körvizsgálatából származó ajánlások alapján három elrendezést javasolnak (17).

36. A koncentrációk meghatározása során az alábbiakat kell szem előtt tartani:

— A NOEC meghatározásához mértani sorozatba rendezett legalább öt/tizenkét koncentrációt kell vizsgálni. Minden egyes kísérleti koncentráció esetében négy ismétlést plusz nyolc kontrollt javasolnak. A szomszédos koncentrációk aránya nem lehet 2,0-nél nagyobb.

— Az EC_x (például EC_{10}, EC_{50}) meghatározásához ajánlott a vizsgálatot legalább annyi koncentráción elvégezni, amennyi legalább négy statisztikailag szignifikánsan különböző átlagos választ idéz elő ezeken a koncentrációkon. Minden egyes kísérleti koncentráció esetében legalább két ismétlést és hat kontroll ismétlést javasolnak. A szomszédos koncentrációk aránya változtatható, azaz a várt hatástartományban legfeljebb 1,8-re, a magasabb és az alacsonyabb koncentrációknál 1,8-nél nagyobb értékre vehető fel.

— Egy kombinált módszer lehetővé teszi mint a NOEC, mind az EC_x meghatározását. Nyolc kezelési koncentrációt kell használni mértani sorozatban. Kezelésenként négy ismétlés plusz nyolc kontroll ajánlott. A szomszédos koncentrációk aránya nem lehet 1,8-nél nagyobb.

A teszt időtartama és a mérések

37. A 28. napon az élő kifejlett férgeket megfigyelik és megszámolják. A kifejlett férgek viselkedésében (pl. a talajba való beásásra való képtelenség; mozdulatlan fekvés) és morfológiájában (pl. nyílt sebek) mutatkozó elváltozásokat is feljegyzik. A kifejlett férgeket ezután eltávolítják a vizsgálati edényből, majd megszámolják és megmérik őket. Az értékelés előtt a férgeket tartalmazó talaj áthelyezése egy tiszta tálcára megkönnyítheti a kifejlett egyedek megkeresését. A talajból eltávolított férgeket mérés előtt le kell mosni (ionmentesített vízzel), és a felesleges vizet a férgeket rövid időre szűrőpapírra helyezve el kell távolítani. Az ebben az időben fel nem lelhető férgeket elhullottnak kell tekinteni, mivel abból kell kiindulni, hogy az ilyen férgek az értékelés előtt elpusztultak és lebomlottak.

▼M6

38. Ha a talajt eltávolították az edényekből, ezután visszatöltik oda (mínusz a kifejlett férgek, de tartalmazva az előállított bábokat). A talajt ezután további négy hétig inkubálják megegyező vizsgálati körülmények között, kivéve, hogy etetésre csak egyszer kerül sor ennek a vizsgálati fázisnak az elején (lásd a 33. pontot).

39. A második 4 hetes időszak végén az 5. függelékben leírt eljárások segítségével meghatározzák a vizsgálati talajban található bábokból kikelt fiatal egyedek számát, valamint a bábok számát. A férgek károsodásának vagy sérülésének jeleit is fel kell jegyezni az egész vizsgálati időszakban.

Határérték-vizsgálat

40. Ha a dózisbehatároló vizsgálat során nem figyelhető meg hatás a legmagasabb koncentrációban (azaz az 1 000 mg/kg koncentrációban), a reprodukciós vizsgálatot határérték-vizsgálatként lehet elvégezni az 1 000 mg/kg vizsgálati koncentráció használatával. A határérték-vizsgálat lehetőséget nyújt annak bizonyítására, hogy a szaporodásra vonatkozó NOEC magasabb a határérték-koncentrációnál, miközben minimálisra csökkenthető a vizsgálatnál használt férgek száma. Nyolc ismétlést kell használni mind a kezelt talaj, mind a kontroll esetében.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

41. Bár a 6. függelék rövid áttekintést ad, ebben a vizsgálati módszerben nincs egyértelmű statisztikai iránymutatás megadva a vizsgálati eredmények elemzésére.

42. Az egyik végpont a mortalitás. A kifejlett férgek viselkedésében (pl. a talajba való beásásra való képtelenség; mozdulatlan fekvés a vizsgálati edény üvegfala mentén) és morfológiájában (pl. nyílt sebek) mutatkozó elváltozásokat is fel kell azonban jegyezni a fiatal egyedek jelenlétével együtt. Rendszerint probit analízist (18) vagy logisztikus regressziót kell alkalmazni az LC_{50} meghatározására. Olyan esetekben azonban, ahol ez az elemzési módszer nem megfelelő (pl. ha kevesebb, mint három koncentráció áll rendelkezésre részleges pusztulással), alternatív módszereket lehet alkalmazni. Ezek közé a módszerek közé tartoznak a mozgóátlagok (19), a vágott Spearman–Karber módszer (20) vagy az egyszerű interpoláció (pl. az LC_0 és LC_{100} geometriai átlaga az LC_0 négyzetgyöke és az LC_{100} szorzataként számítva).

43. A másik végpont a fekunditás (azaz a nemzett fiatal egyedek száma). Ugyanakkor – a dózisbehatároló vizsgálathoz hasonlóan – minden más káros jelet is fel kell tüntetni a végleges jelentésben. A statisztikai elemzés megköveteli a szaporodás kezelésenkénti és kontrollonkénti számtani átlagának $\bar{x}$ és szórásának kiszámítását.

44. Ha varianciaanalízist végeztünk, a szórást (s) és a szabadságfokot (df) helyettesíteni lehet az ANOVA-ból nyert összevont varianciabecsléssel, illetve annak szabadságfokával, amennyiben a variancia nem függ a koncentrációtól. Ebben az esetben a kontoll és a kezelések varianciáit kell használni. Ezeket az értékeket általában kereskedelmi statisztikai szoftver segítségével számítják ki, ismétlésként az edényenkénti eredményeket használva. Ha a negatív és oldószeres kontrollok esetében az adatok összevonása tűnik ésszerűnek, nem pedig az egyikükkel szembeni tesztelés, meg kell ezeket a kontrollokat vizsgálni, hogy nem különböznek-e szignifikáns mértékben (a megfelelő teszteket lásd a 47. pontban és a 6. függelékben).

45. A további statisztikai vizsgálatok és következtetések attól függenek, hogy az ismétlések értékei normál eloszlást mutatnak-e és a szórásnégyzetek tekintetében homogének-e.

▼M6

A NOEC becslése

46. A nagy statisztikai erejű teszteket kell előnyben részesíteni. Fel kell használni a korábbi körvizsgálatok során szerzett tapasztalatokból vagy egyéb történelmi adatokból leszűrt információkat annak megítélésére, hogy az adatok nagyjából normál eloszlásúak-e. A variancia homogenitása (homoszkedaszticitás) sokkal kritikusabb. A tapasztalat azt mutatja, hogy a szórás gyakran együtt növekszik az átlaggal. Ezekben az esetekben az adatok transzformációja vezethet el a homoszkedaszticitáshoz. Az ilyen transzformációnak azonban a vizsgált adatok helyett a történelmi adatokkal kapcsolatos tapasztalatokon kell alapulnia. A homogén adatokkal többféle vizsgálatot kell végezni, például a Williams-féle próbát (α = 0,05, egyoldalas) (21) (22), vagy bizonyos esetekben a Dunnett-féle próbát (23) (24). Meg kell jegyezni, hogy egyenlőtlen replikáció esetében a táblázat t-értékeit a Dunnett és Williams által javasoltak szerint korrigálni kell. A nagy eltérések miatt időnként a válaszok nem növekednek/csökkennek szabályosan. A monotonitástól való ilyen jelentős eltérés esetében a Dunnett-féle próba megfelelőbb. Ha a homoszkedaszticitástól való eltérések figyelhetők meg, ésszerű lehet közelebbről megvizsgálni a varianciára gyakorolt lehetséges hatásokat annak eldöntésére, hogy a t-próbákat lehet-e a statisztikai erő nagyobb mértékű elvesztése nélkül alkalmazni (25). Ehelyett többszörös U-próba, például a Holm szerint módosított Bonferroni-féle U-próba (26), vagy ha az adatok heteroszkedaszticitást mutatnak ugyan, de egyébként mögöttes monoton dózis-válasszal jellemezhetők, más nemparaméteres próba (pl. a Jonckheere–Terpstra- (27) (28) vagy a Shirley-próba (29) (30)) is alkalmazható, és általában előnyben kell ezeket részesíteni a nem egyenlő szórásnégyzeteket feltételező t-próbákkal szemben. (lásd még a 6. függelékben található sémát).

47. Ha a határérték-vizsgálat megtörtént, és a paraméteres vizsgálati eljárások előfeltételei (normalitás, homogenitás) teljesülnek, akkor a páros Student-féle t-próbát lehet használni, egyébként pedig Mann–Whitney-féle U-próbát (31).

Az EC_x becslése

48. Bármely EC_x érték kiszámításához a kezelésenkénti átlagokat használják a regressziós analízishez (lineáris vagy nem lineáris), miután felállították a megfelelő dózis-válasz függvényt. A férgek növekedésének – mint folyamatos válasznak – az EC_x értékei megfelelő regressziós analízis alkalmazásával becsülhetőek (32). A kvantált adatok (mortalitás/túlélés) és a nemzett utódok számának leírására alkalmas függvények között van a 2–4 paramétert tartalmazó normális szigmoid, logisztikai vagy Weibull-féle függvény, amelyek közül néhány hormetikus válaszok modellezésére is képes. Ha egy dózis-válasz függvényt lineáris regresszióanalízissel illesztettek, szignifikáns r^2 (determinációs együttható) értéket és/vagy meredekséget kell találni a regresszióanalízissel, mielőtt az EC^x becslésére kerülne sor, amelyet a kontroll átlaga x %-ának megfelelő értéknek a regresszióelemzéssel talált egyenletbe való behelyezésével végeznek el. 95 %-os megbízhatósági határokat Fieller szerint (hivatkozás: Finney (18)) vagy egyéb megfelelő modern módszerek segítségével kell kiszámítani.

49. Alternatív megoldásként a választ a modell paraméter százalékaként vagy arányaként modellezik, amelyet a kontroll átlagos válaszaként értelmeznek. Ezekben az esetekben a normál (logisztikai, Weibull) szigmoid görbe gyakran könnyen illeszthető az eredményekhez a probit regressziós eljárás alkalmazásával (18). Ezekben az esetekben a súlyozó függvényt ki kell igazítani a metrikus válaszokhoz a Christensen által megadottak szerint (33). Ha azonban hormetikus hatást figyeltek meg, a probitanalízist négyparaméteres logisztikai vagy Weibull-függvénnyel kell felváltani, amelyet nem lineáris regressziós eljárással illesztenek (34). Ha az adatokhoz nem illeszthető megfelelő dózis-válasz függvény, alternatív módszereket lehet használni az EC_x és megbízhatósági határai becslésére, mint például a Thompson-féle mozgóátlagokat (19) vagy a vágott Spearman-Karber eljárást (20).

VIZSGÁLATI JEGYZŐKÖNYV

50. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

▼M6

Vizsgált vegyi anyag:

— a vizsgált vegyi anyag meghatározó leírása, tételszám, CAS-szám, tisztaság;

— a vizsgált vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságai (pl. log Kow, vízoldhatóság, gőznyomás, Henry-állandó (H) és a vizsgált vegyi anyag sorsára és viselkedésére vonatkozó információk);

A vizsgált élő szervezetek:

— felhasznált kísérleti állatok: faj, tudományos név, beszerzési forrás és tenyésztési körülmények;

— vizsgált élő szervezetek kor és méret(tömeg) tartománya.

Vizsgálati körülmények

— a vizsgálati talaj előkészítésére vonatkozó adatok;

— a talaj maximális víztartó képessége;

— a vizsgált anyag talajba történő bejuttatására szolgáló technika ismertetése;

— a vizsgált vegyi anyag bejuttatásához használt kisegítő vegyi anyagokra vonatkozó részletek;

— a permetező eszköz kalibrációs adatai, ha szükséges;

— a kísérleti terv és eljárások leírása.

— a vizsgálati edények mérete és a vizsgálati talaj mennyisége;

— vizsgálati körülmények: fényerő, világos-sötét ciklusok időtartama, hőmérséklet;

— az etetési rend leírása, a a vizsgálatban használt eledel típusa és mennyisége, etetési dátumok;

— a talaj pH-ja és víztartalma a vizsgálat elején és végén.

Vizsgálati eredmények:

— a kifejlett egyedek mortalitása (%) vizsgálati edényenként a vizsgálat első 4 hetének végén;

— a kifejlett egyedek teljes tömege a vizsgálat elején az egyes vizsgálati edényekben;

— az élő kifejlett egyedek testtömegének változása (a kiindulási tömeg %-ában) az egyes vizsgálati edényekben a vizsgálat első négy hetében;

— az előállított fiatal egyedek száma az egyes vizsgálati edényekben a vizsgálat végén;

— a nyilvánvaló vagy kóros tünetek, illetve a jól megfigyelhető magatartásbeli változások leírása;

— a referencia-vegyianyaggal kapott eredmények;

— a reprodukciós LC_{50}, NOEC és/vagy EC_x (pl. EC_{50}, EC_{10}) érték, adott esetben konfidenciaintervallumokkal, a kiszámítására használt illesztett modell grafikonja, valamint minden olyan információ és megfigyelés, amely segítséget nyújthat az eredmények értelmezéséhez;

— a dózis-válasz kapcsolat ábrázolása;

— az egyes vizsgálati edényekre vonatkozó eredmények;

Az e vizsgálati módszerben leírt eljárásoktól való eltérések és a vizsgálat során bekövetkezett valamennyi szokatlan esemény.

IRODALOM

(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) E melléklet C.8. fejezete: Földigiliszták akut toxicitási vizsgálata.

(5) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1996). Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földigilisztára (Eisenia fetida). 2. rész: A szaporodásra gyakorolt hatások meghatározása, No. 11268-2. ISO, Genf.

(6) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1993). Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földigilisztára (Eisenia fetida). 1. rész: Az akut toxicitás meghatározása mesterséges talaj használatával, No. 11268-1. ISO, Genf.

(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 (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1994). Talajminőség. A pH meghatározása, No. 10390. ISO, Genf.

(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 (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1992). Talajminőség. A vízviszszatartási jellemzők meghatározása – Laboratóriumi módszerek, No. 11274. ISO, Genf.

(16) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1993). Talajminőség. A szárazanyag és a víztartalom meghatározása tömeg alapján – Gravimetriás módszer, No. 11465. ISO, Genf.

(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 comparisons procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(24) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

(26) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(27) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

(30) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(31) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

(32) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485–1494.

(33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(34) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

1. függelék

Fogalommeghatározások

E vizsgálati módszer alkalmazásában a következő fogalommeghatározások alkalmazandók:

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

EC_x (hatáskoncentráció x % hatás eléréséhez): az a koncentráció, amely valamely hatás x %-át okozza a vizsgálati szervezetekben egy adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva. Ebben a vizsgálatban a hatáskoncentrációk a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában vannak kifejezve.

LC_0 (nem letális koncentráció): a vizsgált anyag azon koncentrációja, amely nem pusztítja el a kitett vizsgált szervezeteket egy adott időtartamon belül. Ebben a vizsgálatban a LC_0 értékét a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában fejezik ki.

LC_{50} (közepesen letális koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon koncentrációja, amely a kitett vizsgált szervezetek 50 %-át elpusztítja egy adott időtartamon belül. Ebben a vizsgálatban a LC_{50} értékét a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában fejezik ki.

LC_{100} (teljesen letális koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon koncentrációja, amely a kitett vizsgált szervezetek 100 %-át elpusztítja egy adott időtartamon belül. Ebben a vizsgálatban a LC_{100} értékét a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában fejezik ki.

LOEC (észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon legalacsonyabb koncentrációja, amelynek még statisztikailag szignifikáns hatása van ($p < 0,05$). Ebben a vizsgálatban a LOEC értékét a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában fejezik ki. A LOEC értékét meghaladó valamennyi vizsgálati koncentrációnak rendszerint olyan hatást kell mutatnia, amely statisztikailag különbözik a kontroll hatásától. A LOEC fenti meghatározása tekintetében megállapítható bárminemű eltérést indokolni kell a vizsgálati jelentésben.

NOEC (észlelhető hatást még nem okozó koncentráció): a vizsgált vegyi anyag közvetlenül a LOEC alatt elhelyezkedő azon legmagasabb koncentrációja, amelyen nem figyelhető meg hatás. Ebben a vizsgálatban a NOEC-nek megfelelő koncentrációnak nincs statisztikailag szignifikáns hatása ($p > 0,05$) az adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva.

Szaporodási sebesség: az előállított fiatal férgek átlagos számának és a felnőtt egyedek számának hányadosa a vizsgálati időszakban.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼**M6**

2. függelék

A talaj maximális víztartó képességének meghatározása

A talaj maximális víztartó képességének meghatározására szolgáló alábbi módszert találták megfelelőnek. Leírása az ISO DIS 11268-2 C. mellékletében található (1).

Gyűjtsön össze meghatározott mennyiségű (pl. 5 g) vizsgálati táptalajt alkalmas mintavételi eszköz (csigás cső, stb.) segítségével. Fedje le a cső alját egy darab szűrőpapírral, töltse meg vízzel, majd tegye egy vízfürdőben elhelyezett állványra. A csövet fokozatosan víz alá kell meríteni addig, amíg a víz szintje a talaj teteje fölé nem emelkedik. Ezután a csövet a vízben kell hagyni körülbelül három órán keresztül. Mivel nem lehet a talaj hajszálereibe felszívódott minden vizet benntartani, a talajmintát hagyni kell lecsepegni két órán keresztül úgy, hogy a csövet nagyon vizes finomra őrölt kvarchomokból készített ágyra kell helyezni egy fedett edényben (hogy ne száradjon ki). Az ezután 105 °C-on tömegállandóságig szárított mintát meg kell mérni. A víztartó képességet (WHC) a következők szerint kell kiszámítani:

$$\text{WHC (a száraz tömeg \% – ában)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Ahol:

S = a vízzel telített szubsztrátum + a cső tömege + a szűrőpapír tömege

T = tára (cső tömege + szűrőpapír tömege)

D = a szubsztrátum száraz tömege

HIVATKOZÁSOK:

(1) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1996). Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földigilisztára (Eisenia fetida). 2. rész: A szaporodásra gyakorolt hatások meghatározása, No. 11268-2. ISO, Genf.

▼**M6**

3. függelék

A talaj pH-értékének meghatározása

A talajminták pH-értékének meghatározására szolgáló következő módszer az ISO 10390 „Talajminőség. A pH meghatározása” szabványban (1) található leíráson alapul.

A meghatározott mennyiségű talajt szobahőmérsékleten szárítják legalább 12 órán keresztül. Ezután talajszuszpenziót (amely legalább 5 gramm talajt tartalmaz) készítenek ötszörös térfogatú 1 mólos analitikai tisztaságú kálium-klorid (KCl) oldattal vagy 0,01 mólos analitikai tisztaságú kalcium-klorid ($CaCl_2$) oldattal. A szuszpenziót öt percig alaposan rázzák, majd legalább 2 órán át állni hagyják, de nem tovább, mint 24 órán át. Ezután megmérik a folyékony fázis pH-ját pH-mérővel, amelyet minden mérés előtt pufferoldatok megfelelő sorozatával (például pH = 4,0 és 7,0) kalibrálnak.

HIVATKOZÁSOK:

(1) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1994). Talajminőség. A pH meghatározása, No. 10390. ISO, Genf.

▼M6

4. függelék

Az Eisenia fetida/Eisenia andrei tenyésztése

A tenyésztést lehetőleg klímakamrában, 20 °C ± 2 °C-on kell végezni. Ezen a hőmérsékleten és elegendő táplálék biztosításával a férgek körülbelül 2–3 hónap után éretté válnak.

Mindkét faj állati eredetű trágyák széles körében tenyészthető. Az ajánlott tenyésztőközeg ló- vagy szarvasmarhatrágya és tőzeg 50:50 arányú keveréke. Ellenőrizni kell, hogy a teheneket vagy lovakat, amelyek a trágyát biztosítják, nem kezelik vegyi anyagokkal, például hozamfokozókkal, nematicidekkel vagy hasonló állatgyógyászati készítményekkel, amelyek hátrányosan érinthetnék a férgeket a vizsgálat során. Saját gyűjtésű, „organikus” forrásból származó trágya használata ajánlott, mert a tapasztalat azt mutatja, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható, kerti trágyaként használt trágya káros hatással lehet a férgekre. A közegnek körülbelül pH 6–7 értékkel (kalcium-karbonáttal beállítva) és alacsony ionos vezetőképességgel (6 mS/cm alatt vagy 0,5 %-nál alacsonyabb sókoncentrációval) kell rendelkeznie, valamint nem szabad ammóniával vagy állati vizelettel túlságosan szennyezettnek lennie. A szubsztrátumnak nedvesnek kell lennie, de ne legyen túl vizes. A 10–50 literes tenyésztődobozok megfelelőek.

Ahhoz, hogy szabványos életkorú és méretű (tömegű) giliszták álljanak a rendelkezésünkre, a legcélszerűbb bábokból kezdeni a tenyésztést. A kultúrát létrehozása után úgy tartják fenn, hogy kifejlett férgeket helyeznek friss szubsztrátumot tartalmazó tenyésztődobozba 14–28 napra, lehetővé téve új bábok előállítását. A kifejlett egyedeket ezután eltávolítják, és a bábokból előállított fiatal férgeket a következő kultúra alapjául használják. A férgeket folyamatosan etetik állati hulladékkal, és időről időre friss szubsztrátumba helyezik át őket. A tapasztalat azt mutatja, hogy a levegőn szárított finomra őrölt tehén- vagy lótrágya, illetve a zabpehely megfelelő eledel. Biztosítani kell, hogy a teheneket vagy lovakat, amelyek a trágyát biztosítják, nem kezelik vegyi anyagokkal, például hozamfokozókkal, amelyek hátrányosan érinthetnék a férgeket a hosszútávú tenyésztés során. A bábokból kikeltek férgeket a vizsgálatok elvégzésére használják, ha azok 2–12 hónapos korúak és kifejlettnek tekinthetők.

A férgeket egészségesnek lehet tekinteni, ha azok mozognak a szubsztrátumban, nem próbálják elhagyni a szubsztrátumot, és folyamatosan szaporodnak. A szubsztrátum kimerülését jelzi, ha a férgek nagyon lassan haladnak, és posterior végük sárga színű. Ebben az esetben ajánlott friss szubsztrátum biztosítása és/vagy a betelepítési egyedsűrűség csökkentése.

▼M6

5. függelék

A bábokból kikelt fiatal férgek megszámolásának technikái

A férgek kézi kiválogatása a talajszubsztrátumból nagyon időigényes. Ezért két alternatív módszer ajánlott:

a) A vizsgálati edényeket vízfürdőbe helyezik, kezdetben 40 °C hőmérsékleten, amely 60 °C-ra emelkedik. Körülbelül 20 perc után a fiatal férgeknek meg kell jelennie a talaj felszínén, ahonnan könnyen el lehet távolítani és meg lehet számolni őket.

b) A vizsgálati talajt át lehet mosni szitán a van Gestel és munkatársai által kifejlesztett módszerrel (1), feltéve, hogy a talajhoz adott tőzeg és trágya vagy zabpehely finom porrá lett őrölve. Két 0,5 mm lyukbőségű szitát (átmérő: 30 cm) helyeznek egymás tetejére. A vizsgálati edény tartalmát erőteljes sugarú csapvízzel átmossák a szitákon, és a fiatal férgek és a bábok fennakadnak, főleg a felső szitán. Fontos megjegyezni, hogy a felső szita teljes felületét nedvesen kell tartani a művelet során, hogy a fiatal férgek egy vízrétegen ússzanak, ami megakadályozza, hogy átkússzanak a szita pórusain. A legjobb eredményeket akkor lehet kapni, ha zuhanyrózsát használnak.

Miután az egész táptalajt átmosták a szitán, a fiatal férgeket és a bábokat a felső szitából egy tálba lehet öblíteni. A tál tartalmát ezután állni hagyják, ami lehetővé teszi, hogy az üres bábok a víz felszínén lebegjenek, a teli bábok és a fiatal férgek pedig lesüllyedjenek a tál aljára. A vizet ezután leöntik, és a fiatal férgeket és bábokat áthelyezik egy kevés vizet tartalmazó Petri-csészébe. A férgeket megszámlálás céljából tűvel vagy csipesszel lehet eltávolítani.

A tapasztalat azt mutatja, hogy az a) módszer jobban megfelel a fiatal férgek extrakciójára, mivel azok még egy 0,5 mm-es szitán is átmosódhatnak.

A férgek (és adott esetben a bábok) talajszubsztrátumból való eltávolítására használt módszer hatékonyságát mindig meg kell határozni. Ha a fiatal férgeket kézi válogatásos módszerrel gyűjtik össze, célszerű a műveletet kétszer elvégezni az összes mintán.

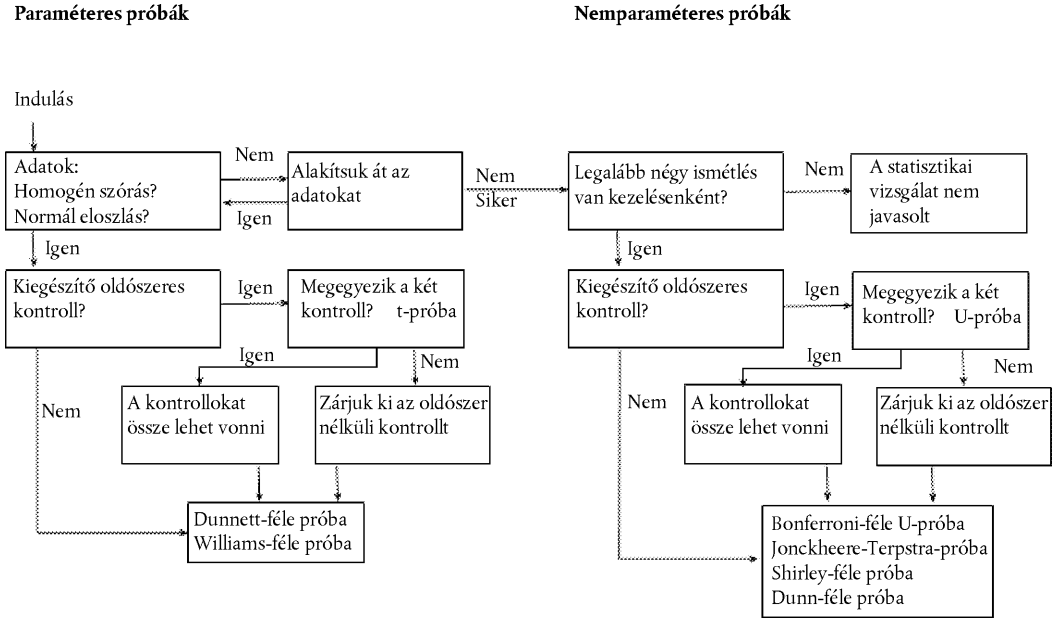
Hivatkozások:

(1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. Pedobiologia 32:367-371.

▼**M6**

6. függelék

Az adatok statisztikai értékelésének áttekintése (a NOEC meghatározása)



▼M6

C.34. AZ ANAEROB BAKTÉRIUMAKTIVITÁS GÁTLÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSA – AZ ANAEROB EMÉSZTÉSŰ (SZENNYVÍZ) ISZAP GÁZTERMELÉSÉNEK CSÖKKENTÉSE

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 224. vizsgálati iránymutatásában (2007) leírt módszerrel. A vízi környezetbe engedett vegyi anyagok aerob és anaerob zónákon egyaránt áthaladnak, ahol lebomolhatnak és/vagy gátolhatják a bakteriális tevékenységet; néhány esetben évtizedekig vagy hosszabb ideig zavartalanul az anaerob övezetekben maradhatnak. A szennyvízkezelés első szakasza – amely elsődlegesen ülepedést jelent – aerob folyamat a felülúszó folyadékban és anaerob az alulúszó iszapban. Ezt a második szakaszban egy aerob zóna követi az eleveniszapos levegőztető tartályban és egy anaerob zóna az alulúszó iszapban a másodlagos ülepítő tartályban. A két szakaszból származó iszapot általában metán és szén-dioxid képződésével járó anaerob kezelésnek vetik alá, amelyeket általában villamos energia előállítására használnak. A tágabb környezetben az öblök, folyótorkolatok és tengerek üledékét elérő vegyi anyagok valószínűleg ezekben az anaerob zónákban maradnak a végtelenségig, hacsak biológiailag nem lebonthatók. Egyes vegyi anyagok nagyobb hányada általában eléri ezeket a zónákat fizikai tulajdonságainak köszönhetően, mint például az alacsony vízoldhatóság, a szuszpendált szilárd anyagokhoz való nagyfokú adszorpció, valamint az aerob biológiai lebomlásra való képesség hiánya.

2. Bár kívánatos, hogy a környezetbe kibocsátott vegyi anyagok mind aerob, mind anaerob körülmények között biológiailag lebonthatók legyenek, elengedhetetlen, hogy az ilyen vegyi anyagok ne gátolják a mikroorganizmusok aktivitását egyik zónában sem. Az Egyesült Királyságban már előfordult néhány eset, amikor például az ipar által kibocsátott pentaklórfenol a metánképződés teljes gátlását okozta, ami azt eredményezte, hogy a gátolt iszapot igen nagy költséggel át kellett szállítani a rothasztóból „biztonságos” helyekre, és egészséges rothasztó iszapot kellett behozni a szomszédos létesítményekből. De már előfordult számos olyan eset is, amelyben több más vegyi anyag a rothasztás kevésbé súlyos zavarát okozta – beleértve az alifás halogén-szénhidrogéneket (vegytisztítás) és a mosószereket –, ami a rothasztó hatékonyságának jelentős károsodásához vezetett.

3. Csak egyetlen vizsgálati módszer, a C.11 (1) foglalkozik a baktériumaktivitás gátlásával (az eleveniszap légzése), amely a vizsgált vegyi anyagoknak az oxigénfelvétel sebességére gyakorolt hatását értékeli szubsztrátum jelenlétében. A módszert széles körben használják, hogy korai figyelmeztetést adjon a vegyi anyagoknak a szennyvizek aerob kezelésére gyakorolt lehetséges káros hatásairól, valamint hogy megadja a vizsgált vegyi anyagoknak a különböző biológiai lebonthatósági vizsgálatok során használandó nem gátló koncentrációit. A C.43 vizsgálati módszer (2) korlátozott lehetőséget kínál a vizsgált vegyi anyagnak az anaerob iszap gáztermelésére gyakorolt toxicitásának meghatározására, amelyet szokásos szilárd anyag koncentrációjának egytizedére hígítanak ahhoz, hogy lehetővé tegye a kívánt pontosságot a százalékos biológiai lebomlás értékelése során. Mivel a hígított iszap érzékenyebb lehet a gátló vegyi anyagokkal szemben, az ISO-csoport úgy döntött, hogy összeállít egy hígítatlan iszapot tartalmazó módszert. Legalább három szöveget vizsgáltak meg (Dániából, Németországból és az Egyesült Királyságból), és végül két ISO szabványt készítettek, az egyik hígítatlan iszapot használ (ISO 13 641-1 (3)), a másik pedig századrészére hígított iszapot (ISO 13 641-2 (4)), amely a kis baktérium populációval rendelkező sarakat és üledékeket testesíti meg. Mindkét módszert körvizsgálatnak vetették alá (5); az 1. rész elfogadható szabványként megerősítést nyert, de nem volt egyetértés a 2. rész tekintetében. Az Egyesült Királyság úgy vélte, hogy mivel a résztvevők jelentős része nagyon kevés gáz termeléséről számolt be vagy egyáltalán nem volt gáztermelés, részben azért, mert a százalékos gáztér túl magas volt az optimális érzékenységhez (75 %), az eljárás további vizsgálatot igényel.

4. Az Egyesült Királyságban korábban egy 500 ml-es palackokban hígítatlan emésztő iszapot és szubsztrátumként nyers szennyvíziszapot használó manometrikus módszert írtak le (6) (7); a készülék használata nehézkes volt, a nyers iszap bűze pedig kellemetlen. Később Shelton és Tiedje (8) kompaktabb és kényelmes készülékét, amelyet Battersby és Wilson (9) fejlesztett

▼M6

tovább, Wilson és munkatársai sikeresen alkalmazták. (10). Kawahara és munkatársai (11) szabványosabb iszapokat készítettek a laboratóriumban, amelyek számos vegyi anyag anaerob biológiai lebonthatóságának és gátlásának vizsgálatára használhatók. Továbbá, a szubsztrátumként használt nyers iszapot a vizsgálatokban egy századára hígított anaerob iszappal vagy alacsony bakteriális tevékenységű sárral, üledékekkel stb. váltották fel.

5. Ez a módszer hasznos információkat nyújthat a vizsgált vegyi anyag anaerob rothasztók gáztermelésére gyakorolt várható hatásának előrejelzésében. Azonban csak a működő rothasztókat jobban modellező hosszabb vizsgálatok mutathatják ki azt, hogy előfordulhat-e a mikroorganizmusok alkalmazkodása a vizsgált anyaghoz, vagy hogy a valószínűleg felszívódó vagy az iszap által adszorbeálódó vegyi anyagok toxikus koncentrációt alakíthatnak-e ki az ebben a vizsgálatban megengedettnél hosszabb idő alatt.

A VIZSGÁLAT ELVE

6. Anaerob rothasztó iszap (20 g/l és 40 g/l összes szilárd anyag) és egy lebomló szubsztrátum oldat keverékének alikvotjait inkubálják önmagában és a vizsgált vegyi anyag koncentrációsorozatával egyidejűleg, lezárt edényekben, legfeljebb 3 napig. Az előállított gáz mennyiségét (metán plusz szén-dioxid) a palackokban lévő nyomás (Pa) növekedése révén mérik. A gáztermelésnek a vizsgált vegyi anyag különböző koncentrációi által előidézett százalékos gátlását a megfelelő vizsgálati és kontroll palackokban előállított gáz mennyiségből számítják. Az EC_{50} értékét és az egyéb hatáskoncentrációkat a vizsgált vegyi anyagok koncentrációjának – vagy ami általánosabb, a koncentráció logaritmusának – függvényében megnyilvánuló százalékos gátlási grafikonokból számítják.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

7. A vizsgált vegyi anyagokat általában a könnyen hozzáférhető legtisztább formájukban kell használni, mivel egyes vegyi anyagok szennyeződései, például a klór-fenolok, sokkal mérgezőbbek lehetnek, mint maga a vizsgált vegyi anyag. Mindazonáltal meg kell fontolni, hogy a vizsgált vegyület abban a formájukban kell vizsgálni, amelyben azokat előállították/kereskedelmi forgalomba hozták. A formulázott készítmények használata nem szokásos, de a rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok esetében a formulázott anyagok használata megfelelő lehet. A vizsgált vegyi anyag tulajdonságaira vonatkozó információk közül rendelkezésre kell állnia a vízben és egyes szerves oldószerekben oldhatóságnak, a gőznyomásnak, az adszorpciós koefficiensnek, a hidrolízisnek és az anaerob körülmények közötti biológiai lebonthatóságnak.

A MÓDSZER ALKALMAZHATÓSÁGA

8. A vizsgálat vízben oldható vagy oldhatatlan vegyi anyagokra alkalmazható, beleértve az illékony vegyi anyagokat is. De különös figyelemmel kell eljárni a kevéssé oldódó (lásd a (12) irodalmat) és a nagy illékonyságú anyagok esetében. Továbbá, más anaerob helyekről – például sár, telített talajok, üledékek – származó oltóanyagokat is lehet használni. Az anaerob bakteriális rendszereket, amelyek korábban már ki voltak téve mérgező vegyi anyagoknak, alkalmassá lehet tenni arra, hogy aktivitásukat xenobiotikus vegyi anyagok jelenlétében is fenntartsák. Az alkalmazkodott bakteriális rendszerekből származó oltóanyagok nagyobb toleranciát mutatnak a vizsgált vegyi anyagokkal szemben a nem adaptált rendszerekből nyert oltóanyagokhoz képest.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

9. Az eljárás ellenőrzése céljából egy referencia-vegyianyagot is vizsgálnak a normál vizsgálati futtatások részeként felállított megfelelő párhuzamos edények útján; a 3,5-diklór-fenolról kimutatták, hogy az anaerob gáztermelés, valamint az eleveniszap oxigén-felhasználása és egyéb biokémiai reakciók következetes inhibitora. Két másik vegyszerről kimutatták, hogy jobban gátolják a metántermelést, mint a 3,5-diklór-fenol, nevezetesen a metilén-bisz-tiocianátról és a pentaklór-fenolról, de a velük elért eredményeket nem validálták. A pentaklór nem ajánlott, mivel nem érhető el könnyen tiszta formában.

▼M6

AZ EREDMÉNYEK REPRODUKÁLHATÓSÁGA

10. Egy nemzetközi körvizsgálatban (5) a 3,5-diklór-fenol és a 2-bróm-etán-szulfonsav esetében az EC_{50}-érték 10 részt vevő laboratórium közötti reprodukálhatósága csak közepes mértékű volt. (Az előbbi koncentrációtartománya 32–502 mg/l volt, az utóbbié pedig 220–2 190 mg/l.)

Laboratóriumok száma	mg/l			mg/g iszap		
	középérték	s.d.	cv (%)	középérték	s.d.	cv (%)
	3,5-diklór-fenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-bróm-etán-szulfonsav					
10	1 058	896	85	34	26	76

EC_{50} adatok a körvizsgálatból – hígítatlan iszap

11. A laboratóriumok közötti nagy variációs együtthatók jelentős mértékben az iszap mikroorganizmusok érzékenységében mutatkozó különbségeket tükrözik, amelyek akár a vizsgált vegyi anyaggal vagy más, kémiailag rokon vegyülettel történt korábbi expozíció miatt, vagy annak hiányában alakulhattak ki. A pontosság, amellyel az iszap-koncentráción alapuló EC_{50} értéket meghatározták, alig volt jobb, mint a „térfogati" érték (mg/l). A három laboratórium, amely megadta a 3,5-diklór-fenol EC_{50}-értékek a pontosságát, sokkal kisebb variációs együtthatót mutatott (22, 9 és 18 % az EC_{50} mg/g esetében), mint a tíz laboratórium átlagai. A három laboratórium átlaga 3,1, 3,2 és 2,8 mg/g volt. A laboratóriumon belüli alacsonyabb, elfogadható variációs együtthatók és a laboratóriumok értékei közötti sokkal magasabb együtthatók – azaz 9–22 % és 92 % – összehasonlítása azt jelzi, hogy jelentős különbségek vannak az egyes iszapok tulajdonságai között.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

12. A szokásos laboratóriumi berendezéseket, illetve a következő eszközöket kell használni:

a) Inkubátor – szikramentes és 35 °C ± 2 °C-on tartott;

b) Nyomásálló üveg vizsgálati edények: megfelelő névleges méretű edények ([1]), amelyek mindegyike olyan légmentesen záró bevont szeptummal van felszerelve, amely képes mintegy 2 bar vagy 2 x 10^5 Pa nyomást megtartani (a bevonat pl. PTFE = politetraflouretilénből készüljön). 125 ml névleges térfogatú üveg szérumpalackok ajánlottak, amelyek tényleges térfogata 160 ml és szérum szeptumokkal ([2]) és peremezett alumínium gyűrűkkel vannak lezárva; de a 0,1–1 liter közötti teljes térfogatú palackok is sikeresen alkalmazhatók;

([1]) Az ajánlott méret 0,1–1 liter.

([2]) Légmentesen záró szilikonszeptumok használata ajánlott. Ajánlott továbbá megvizsgálni a sapkák, és különösen a butilkaucsukból készült szeptumokgázbiztosságát, mert számos, a kereskedelmi forgalomban kapható szeptum nem eléggé légmentes a metánnal szemben, és egyes szeptumok nem maradnak stabilan rögzülve, ha a vizsgálat körülményei között tűvel átszúrják.

— A légmentesen záró bevont szeptumok ajánlottak, és illékony vegyi anyagok esetében kötelező ezeket használni (egyes kereskedelemben kapható szeptumok viszonylag vékonyak, kevesebb mint 0,5 cm vastagságúak, és nem maradnak gáztömörek az injekciós tűvel történő átszúrás után);

— A butilkaucsukból készült szeptumok (körülbelül 1 cm) akkor ajánlottak, ha a vizsgálati anyag nem illékony (ezek általában légmentesen záróak maradnak az átszúrás után).

— A vizsgálat megkezdése előtt ajánlott a szeptumokat gondosan átvizsgálni abból a szempontból, hogy képesek-e légmentesen záróak maradni az átszúrás után.

▼M6

c) Precíziós nyomásmérő ([1]) és tűcsatlakozó

A teljes gáztermelést (metán plusz szén-dioxid) olyan nyomásmérő segítségével mérik, amely úgy lett kialakítva, hogy lehetővé tegye a termelt gáz mérését és kiszellőztetését. A megfelelő eszközök egyik példája a fecskendőtűhöz csatlakoztatott kézi precíziós nyomásmérő; egy háromutas légmentesen záró szelep teszi lehetővé a túlnyomás kiengedését (1. függelék). A nyomásérzékelő cső és szelep belső térfogatát a lehető legalacsonyabban kell tartani, hogy a készülék térfogatának figyelmen kívül hagyása által okozott hibák elhanyagolhatóak legyenek;

d) Szigetelt edények a rothasztó iszap szállításához;

e) Háromutas szelepek;

f) Szita, 1 mm^2-es lyukbőséggel;

g) Tároló, a rothasztó iszaphoz, üveg- vagy nagy sűrűségű polietilén palack, kapacitása körülbelül 5 liter, keverővel és a nitrogéngáz fejtéren történő áthaladásához szükséges eszközökkel ellátott (lásd a 13. pontot);

h) membránszűrők (0,2 μm) a szubsztrátum sterilizálására;

i) mikrofecskendők, a nyomásérzékelőnek (lásd a 12. c) pontot) a palackok fejteréhez (lásd a 12. b) pontot) való légmentesen záró csatlakoztatásához; továbbá az oldhatatlan folyékony vizsgálati anyagok palackokba történő beadagolásához;

j) kesztyűs manipulátor, opcionális, de ajánlott, enyhe pozitív nitrogénnyomással.

Reagensek

13. Mindvégig analitikai tisztaságú reagenseket használjunk. Mindvégig nagy tisztaságú, 5 μl/l-nél kisebb oxigéntartalmú nitrogéngázt kell használni.

Víz

14. Ha bármely szakaszban hígítás szükséges, előzőleg légtelenített ionmentesített vizet használjon. Ezen a vízen analitikai vizsgálatokat nem szükséges végezni, de gondoskodjon az ionmentesítő berendezés rendszeres karbantartásáról. A törzsoldatok készítéséhez is ionmentesített vizet használjon. Mielőtt anaerob oltóanyagot adna bármely oldathoz vagy a vizsgálati anyag bármely hígításához, ellenőrizze, hogy azok oxigénmentesek-e. Ezt vagy nitrogéngáznak a hígító vízen (vagy a hígításokon) – az oltóanyag hozzáadása előtt – 1 órán keresztül történő átfúvásával, vagy alternatívaként a hígító víznek oxigénmentes atmoszférában forráspontig történő melegítésével és szobahőmérsékletre való hűtésével lehet elvégezni.

Rothasztott iszap

15. Gyűjtsön aktívan emésztő iszapot egy szennyvíztisztító telep rothasztójából, vagy pedig egy laboratóriumi fermentorból, amely túlnyomórészt háztartási szennyvízből származó iszapot kezel. A laboratóriumi fermentorból származó iszapra vonatkozó gyakorlati tájékoztatást más forrásokban találhat (11). Ha adaptált oltóanyagot szándékoznak használni, az ipari szennyvíztisztító üzemből származó rothasztó iszapot meg lehet fontolni. Tágulásra

([1]) A mérőt a gyártó utasításai szerint rendszeres időközönként használni és kalibrálni kell. Ha az előírt minőségű nyomásmérőt használják (pl. acél membrán tokkal), nincs szükség kalibrálásra a laboratóriumban. Engedéllyel rendelkező intézetnek kell kalibrálnia az ajánlott időközönként. A kalibrálás pontosságát a laboratóriumban 1×10^5 Pa nyomáson mechanikus kijelzővel ellátott nyomásmérő ellenében végzett egypontos méréssel lehet ellenőrizni. Ha ezt a pontot pontosan mérik, a linearitás is változatlan lesz. Ha egyéb mérési eszközöket használnak (a gyártó által hitelesített kalibráció nélkül), rendszeres időközönként konverziót ajánlott végezni a teljes tartományban (2. függelék).

▼M6

képes nagy sűrűségű polietilénből vagy hasonló anyagból készült széles nyakú palackokat használjon az iszapgyűjtéshez. Annyi iszapot töltsön a mintavevő palackokba, hogy a palackokat a tetejétől körülbelül 1 cm-ig megtöltse, zárja le őket szorosan, lehetőleg egy biztonsági szeleppel (12. e) pont), majd helyezze szigetelt tartályokba (12. d) pont) a hőmérsékleti sokk minimalizálása érdekében, amíg átkerülnek a 35 °C ± 2 °C hőmérsékletű inkubátorba. A palackok kinyitásakor vigyázzon, hogy kiengedje a felesleges gáznyomást, akár óvatosan meglazítva a kupakot, vagy háromutas nyomáscsökkentő szelep segítségével (12. e) pont). Előnyös az iszapot a gyűjtéstől számított néhány órán belül felhasználni, egyébként 35 °C ± 2 °C hőmérsékleten nitrogénnel töltött fejtér alatt tárolja legfeljebb 3 napig, amikor kismértékű aktivitásvesztés általában előfordul.

Figyelem – a rothasztó iszap gyúlékony gázokat képez, amelyek tűz- és robbanásveszélyt okoznak; potenciálisan kórokozó mikroorganizmusokat is tartalmaz, ezért megfelelő óvintézkedéseket kell tenni az iszappal való munka során. Biztonsági okokból ne használjon üvegedényeket az iszap gyűjtésére.

Oltóanyag

16. Közvetlenül a felhasználás előtt keverje össze az iszapot enyhe keveréssel, majd öntse át egy 1 mm^2 lyukbőségű szitán (12. f) pont) egy megfelelő üvegbe (12. g) pont), amelynek fejterén nitrogént kell keresztülvezetni. Tegye félre egy mintát az összes száraz szilárd anyag koncentrációjának mérése céljából (lásd pl. ISO 11 923 (13) vagy azzal egyenértékű EU-szabvány). Az iszapot általában hígítás nélkül használja. A szilárd anyagok koncentrációja általában 2 % és 4 % között van (w/v). Ellenőrizze az iszap pH-értékét, és ha szükséges, állítsa be 7 ± 0,5 értékre.

Vizsgálati szubsztrátum

17. Oldjon fel 10 g táplevest (pl. Oxoid), 10 g élesztőkivonatot és 10 g D-glükózt ionmentesített vízben, és hígítsa 100 ml-re. Sterilizálja egy 0,2 μm-es membránszűrőn át történő szűréssel (12. h) pont), és azonnal használja fel vagy 4 °C-on legfeljebb 1 napig tárolja.

Vizsgált vegyi anyag

18. Készítsen külön törzsoldatot minden vízben oldódó vizsgált vegyi anyagból, amely például 10 g/l vegyi anyagot tartalmazzon oxigénmentes hígító vízben (14). Használja ezeknek az oldatoknak megfelelő mennyiségét a koncentráció gradienseket tartalmazó reakciókeverékek elkészítéséhez. Alternatív megoldásként készítsen egy hígítási sort minden egyes törzsoldatból úgy, hogy a vizsgálati palackokhoz adott térfogat azonos legyen minden előírt végső koncentráció esetében. A törzsoldatok pH-értékét 7 ± 0,2 értékre kell beállítani, ha szükséges.

19. A vízben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok esetében forduljon az ISO 10 634 szabványhoz (12) vagy az azzal egyenértékű EU-szabványhoz. Ha szerves oldószer használata szükséges, kerülje el az olyan oldószereket, mint a kloroform és a szén-tetraklorid, amelyekről ismert, hogy erősen gátolják a metántermelést. Készítsen megfelelő koncentrációjú oldatot a vízben oldhatatlan vegyi anyagból egy alkalmas illékony oldószerben, például acetonban vagy dietil-éterben. Adja hozzá a kívánt térfogatú oldószer oldatot az üres vizsgálati palackokhoz (12. b) pont), majd az iszap hozzáadása előtt párologtassa el az oldószert. Az egyéb kezelések esetében használja az ISO 10 634 szabványt (12) vagy az azzal egyenértékű EU-szabványt, de tartsa szem előtt, hogy az emulziók előállításához használt felületaktív anyagok gátolhatják az anaerob gáztermelést. Ha úgy véli, hogy a szerves oldószerek és emulgeálószerek jelenléte műtermékek kialakulását okozza, a vizsgált vegyi anyagot porként vagy folyadékként közvetlenül a vizsgálati keverékhez is hozzá lehet adni. Az illékony vegyi anyagokat és a vízben nem oldódó folyadék halmazállapotú vizsgált vegyi anyagokat a beoltott szérumpalackokba is be lehet injektálni mikrofecskendő használatával (12. i) pont).

▼M6

20. Adja a vizsgált vegyi anyagokat a palackokhoz úgy, hogy a koncentrációk egy mértani sorozatot alkossanak, például 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l és 15,6 mg/l. Ha a toxicitási tartomány a hasonló vegyi anyagok alapján nem ismert, először végezzen előzetes dózisbehatároló vizsgálatot 1 000 mg/l, 100 mg/l és 10 mg/l koncentrációval, hogy behatárolja a megfelelő tartományt.

Referencia-vegyianyag

21. Készítsen vizes oldatot 3,5-diklór-fenolból (10 g/l) minimális mennyiségű 5 mol/l-es nátrium-hidroxid oldatnak a szilárd anyaghoz rázás közben való fokozatos hozzáadásával, amíg az feloldódik. Ezután adjon hozzá oxigénmentes hígítóvizet (14), hogy elérje az előírt térfogatot; az ultrahangos kezelés elősegítheti az oldódást. Egyéb referencia-vegyianyagokat is lehet alkalmazni, ha az EC_{50} átlagos tartományát különböző (különböző forrásból vagy különböző gyűjtési időpontokból származó) oltóanyagokkal végzett legalább három vizsgálatban megállapították.

INTERFERENCIA/HIBÁK

22. Az iszap néhány összetevője feltehetően reagál a potenciális gátlóanyagokkal, elérhetetlenné téve azokat a mikroorganizmusok számára, ami alacsonyabb gátlást vagy a gátlás hiányát eredményezi. Továbbá, ha a iszap már tartalmaz gátló hatású vegyi anyagot, hibás eredmények adódhatnak a vegyi anyag vizsgálata során. Ezeken a lehetőségeken kívül van még számos egyéb azonosított tényező, amely hamis eredményekhez vezethet. Ezeket a 3. függelék sorolja fel, a hibák megszüntetésére vagy legalább csökkentésére szolgáló módszerekkel együtt.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

23. A szükséges ismétlések száma a gátlási indexekhez előírt pontosság fokától függ. Ha a palacktömítések eléggé légmentesen záróak a vizsgálat időtartama alatt, csak egy tételt hoozon létre (legalább hármas ismétlésben) a vizsgálati palackokból minden előírt koncentráción. Hasonlóképpen hozzon létre egy palacktételt a referencia-vegyianyaggal, valamint egy kontroll tételt. Ha azonban a palackok tömítései csak egy vagy néhány átszúrásig megbízhatóak, hozzon létre egy tételt (pl. hármas ismétlésben) a vizsgálati palackokból minden intervallumhoz (t) – amelyek tekintetében eredményt szeretne kapni – a vizsgálandó vegyi anyag valamennyi koncentrációján. Hasonlóképpen hozzon létre „t” palacktételeket a referencia-vegyianyagot tartalmazó, illetve a kontrollcsoportban.

24. Ajánlott a kesztyűs manipulátor (12. j) pont) használata. Legalább 30 perccel a vizsgálat megkezdése előtt indítsa el a gázáramlást a kesztyűs manipulátoron keresztül, amely minden szükséges berendezést tartalmaz. Gondoskodjon róla, hogy az iszap hőmérséklete a 35 °C ± 2 °C tartományon belül legyen a palackok kezelése és lezárása alatt.

Előzetes vizsgálat

25. Ha az iszap aktivitása nem ismert, ajánlott előzetes vizsgálatot végezni. Hozzon létre kontrollokat, például 10 g/l, 20 g/l és 40 g/l szilárd anyag koncentrációval plusz szubsztrátummal, de a vizsgált vegyi anyag nélkül. Továbbá, különböző térfogatú reakciókeverékeket használjon abból a célból, hogy a fejtér és a folyadék térfogatának három vagy négy különböző arányát alakítsa ki. A különböző időtartamok alatt előállított gázmennyiségekből megállapíthatók azok a legmegfelelőbb feltételek, amelyek jelentős mennyiségű gázt eredményeznek és lehetővé teszik a napi kétszeri mérést, valamint lehetővé teszik a nyomás naponta történő felengedését optimális érzékenység mellett ([1]) és robbanásveszély nélkül.

A vizsgált vegyi anyagok hozzáadása

26. A vízben oldódó vizsgált anyagokat üres vizsgálati palackokhoz adja (12. b) pont) vizes oldat formájában (18). Használjon legalább három palackot

([1]) Ez arra a kísérleti összeállításra és azokra a kísérleti feltételekre vonatkozik, amelyek alapján a termelt gáz térfogatát – az üres kontrollokból és a 70–80 % gátlást mutató edényekből – elfogadható hibahatárral meg lehet becsülni.

▼M6

minden koncentrációhoz (20. pont). Oldhatatlan és gyengén oldódó vizsgált vegyi anyag esetében fecskendezze mikrofecskendővel ezek szerves oldószerekkel készített oldatait üres palackokba, hogy a vizsgált vegyi anyag mind az öt koncentrációjához ismétléseket készíthessen. Párologtassa el az oldószert nitrogéngáznak a vizsgált palackokban található oldatok felszíne felett történő átfúvásával. Alternatív megoldásként adjon hozzá oldhatatlan szilárd vegyi anyagokat a szilárd anyag kimért mennyiségében közvetlenül a vizsgálati palackokhoz.

27. Ha az oldhatatlan vagy vízben rosszul oldódó folyadék állapotú vizsgált vegyi anyagokat nem oldószer alkalmazásával adja hozzá, közvetlenül adja hozzá őket a vizsgálati palackokhoz mikrofecskendő használatával az oltóanyag és a vizsgálati szubsztrátum hozzáadása után (lásd a 30. pontot). Az illékony vizsgált vegyi anyagokat is hozzá lehet adni ilyen módon.

Az oltóanyag és a szubsztrátum hozzáadása

28. Keverjen meg megfelelő mennyiségű szűrt rothasztó iszapot (lásd a 16. pontot) egy 5 literes üvegben (12. g) pont), miközben nitrogéngáz halad át a fejtéren. Öblítse át a vizsgált vegyületek vizes oldatait vagy elpárolgott oldószeres oldatait tartalmazó palackokat nitrogéngázzal körülbelül két percig, hogy eltávolítsa a levegőt. Ossza szét a jól kevert iszap alikvotjait (pl. 100 ml) a vizsgálati palackokba nagy hegyű pipettával vagy mérőhengerrel. Lényeges, hogy a pipettát egy lépésben töltse fel a pontos előírt iszaptérfogatra, mivel az iszap szilárd anyagai könnyen leülepszenek. Ha többet szívott fel, ürítse ki a pipettát, és kezdje újra.

29. Ezután adjon hozzá elegendő szubsztrátum oldatot (17. pont), hogy a tápleves, az élesztőkivonat és a D-glükóz egyaránt 2 g/l koncentrációt adjon a keverékben, miközben nitrogén továbbra is átáramlik a palackokon. A következőkben egy példát mutatunk be a vizsgálati tételekre.

A vizsgált anyag végleges tömegkoncentrációja vizsgálati palackokban (mg/l)	A vizsgált vegyi anyag térfogata (ml)		Reagensek és közegek (ml)		
	Törzsoldat a) 10 g/l 18. pont	Törzsoldat b) 1 g/l 18. pont	Hígítóvíz 14. pont	Oltóanyag 16. pont	Szubsztrátum 17. pont
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

Az üveg összes térfogata = 160 ml. A folyadék térfogata = 103 ml
Gáztérfogat = 57 ml, illetve az összes térfogat 35,6 %-a.

30. Hasonlóan öblítsen ki nitrogéngázzal megfelelő számú üres vizsgálati palackot az illékony és nem oldódó folyadék állapotú vizsgált vegyi anyagok számára (lásd a 27. pontot).

▼M6

Kontrollok és referencia-vegyianyagok

31. Hozzon létre legalább hármas ismétléseket csak iszapot és szubsztrátumot tartalmazó palackokból, amelyek kontrollként funkcionálnak. Hozzon létre további ismétléseket, amelyek iszapot, szubsztrátumot és a referencia-vegyianyag, a 3,5-diklór-fenol (21. pont) elegendő törzsoldatát tartalmazzák, hogy 150 mg/l végső koncentrációt eredményezzen. Ennek a koncentrációnak 50 %-kal kell gátolnia a gáztermelést. Alternatív megoldásként hozza létre a referencia-vegyianyag koncentrációsorozatát. Ezen kívül hozzon létre négy extra palackot a pH-mérés céljára, amelyek iszapot, oxigénmentesített vizet és szubsztrátumot tartalmaznak. Adjon hozzá vizsgált vegyi anyagot két palackhoz a legmagasabb vizsgált koncentrációban, és adjon oxigénmentesített vizet a fennmaradó két palackhoz.

32. Gondoskodjon róla, hogy minden palack (vizsgált és referencia-vegyianyagok és kontrollok) azonos térfogatú (V_R) folyadékot tartalmazzon; szükség esetén adjon hozzá oxigénmentesített ionmentesített vizet (14) a térfogat kiegészítése céljából. A fejtér a palack térfogatának 10–40 %-a legyen; a tényleges értéket az előzetes vizsgálatból kapott adatok alapján kell kiválasztani. Miután minden alkotórészt hozzáadott a palackokhoz, húzza ki a gázt szolgáltató tűt, majd gumidugóval és alumínium kupakkal zárja le a palackokat (12. b) pont), a dugót egy csepp ionmentesített vízzel megnedvesítve, ami segíti a behelyezést. Keverjük össze a palackok tartalmát rázással.

A palackok inkubálása

33. Helyezze át a palackokat a szabályozott hőmérsékletű, lehetőleg rázókészülékkel felszerelt inkubátorba, és tartsa fenn a 35 °C ± 2 °C hőmérsékletet. A palackokat sötétben kell inkubálni. Mintegy 1 óra elteltével, egyenlítse ki a palackokban lévő nyomást az atmoszferikus nyomással a nyomásmérőhöz csatlakoztatott fecskendőtűnek (12. c) pont) az egyes palackok tömítésen keresztül történő beszúrásával, nyissa ki a szelepet, amíg a nyomásmérő nullát nem mutat, majd végül zárja el a szelepet. A tűt mintegy 45°-os szögben kell beszúrni, hogy megakadályozható legyen a gáz elszivárgása a palackokból. Ha a palackokat rázóberendezés nélkül inkubálják, a teljes inkubálási időszak alatt naponta kétszer kézzel meg kell rázni őket a rendszer egyensúlyba hozása érdekében. Inkubálja a palackokat és fordítsa meg őket, hogy megelőzze a gáz elvesztését a szeptumon keresztül. A megfordítás azonban nem megfelelő azokban az esetekben, amelyekben az oldhatatlan vizsgált vegyi anyagok a palack aljára tapadhatnak.

A nyomás mérése

34. Ha a palackok elérték a 35 °C ± 2 °C hőmérsékletet, mérje meg és jegyezze fel az erre a célra létrehozott négy palack közül kettő tartalmának pH értékét, és öntse ki a tartalmat; folytassa a megmaradó palackok sötétben történő inkubálását. A következő 48–72 órában naponta két alkalommal mérje meg és jegyezze fel a palackokban uralkodó nyomást a nyomásmérő tűjének az egyes palackok tömítésén keresztül történő beszúrásával, a tűt a mérések között megszárítva. A palackok valamennyi részét tartsa inkubációs hőmérsékleten a mérés során, amelyet a lehető leggyorsabban kell elvégezni. Várja meg, amíg a leolvasott nyomásérték stabilizálódik, majd jegyezze fel. Ezután nyissa ki a szelepet a szellőzéshez, és akkor zárja be, amikor a nyomás nullát mutat. A vizsgálatot még általában a nyomás első kiegyenlítésétől („0. időpont”) számított 48 órán át folytatni kell. A leolvasások és a szellőztetések számát illékony vegyi anyagok esetében egyre (az inkubáció végén) vagy kettőre kell korlátozni a vizsgált anyag elvesztésének minimalizálása érdekében (10).

35. Ha a leolvasott nyomás negatív, ne nyissa ki a szelepet. Néha nedvesség gyűlik össze a fecskendőtűben és a csövekben, amit enyhén negatív nyomásérték jelez. Ebben az esetben húzza ki a tűt, rázza meg a csövet, szárítsa meg egy kendővel, és helyezzen fel egy új tűt.

A pH mérése

36. Mérje meg és jegyezze fel az egyes palackok tartalmának pH értékét az utolsó nyomásmérés után.

▼M6

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények megadása

37. Az egyes ismétlésekhez tartozó palackokra számítsa ki az egyes időpontokban rögzített nyomásértékek összegét és átlagát, és határozza meg az egyes időpontokban az egyes ismétlésekhez tartozó palackokra az átlagos kumulatív bruttó gáznyomást. Ábrázolja a átlagos kumulatív gáztermelés (Pa) görbéit az idő függvényében a kontroll, a vizsgálati és a referencia palackok esetében. Válasszon ki egy időpontot a görbe lineáris részén, általában a 48 órát, és minden koncentrációnál számítsa ki a százalékos gátlást (I) az [1] egyenlet alapján:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1],$$

ahol

I = a százalékos gátlás % -ban;

P_t = a vizsgált anyaggal előállított gáz nyomása a kijelölt időpontban, Pascal (Pa);

P_c = a kontroll által termelt gáz nyomása ugyanabban az időpontban, Pascal (Pa).

Tanácsos mindkét görbét felrajzolni, azaz I-t a koncentrációval szemben és a koncentráció logaritmusával szemben is ábrázolni, és a linearitáshoz közelebb álló görbét választani. Az EC_{50} (mg/l) értékét vizuálisan vagy a linearitáshoz közelebbi görbe regressziós elemzése alapján becsülje meg. Az összehasonlítás céljából hasznosabb lehet, ha a vegyi anyag koncentrációját mg vegyi anyag/g összes száraz szilárd anyag formában fejezi ki. E koncentráció kiszámításához ossza el a térfogati koncentrációt (mg/l) az iszap száraz szilárd anyagainak térfogati koncentrációjával (g/l) (16).

38. Számítsa ki az alkalmazott referencia-vegyianyag egyetlen koncentrációja által elért százalékos gátlást vagy az EC_{50} értékét, ha elegendő számú koncentrációt vizsgáltak.

39. A nyomásmérő kalibrációs görbéje (2. függelék) alapján konvertálja át a kontroll által termelt gáz átlagos nyomását – P_c (Pa) – térfogatra, és ebből számítsa ki a gázhozamot a 100 ml hígítatlan iszapból 2–4 % (20–40 g/l) szilárdanyag koncentráció mellett 48 óra alatt előállított térfogatban kifejezve.

Érvényességi feltételek

40. Az ISO laboratóriumok közötti vizsgálat eredményei (5) azt mutatták, hogy a referencia-vegyianyag (3,5-diklór-fenol) a gáztermelés 50 %-os gátlását okozta a 32 mg/l-től 510 mg/l-ig terjedő koncentrációsorozatban, amelynek átlaga 153 mg/l volt (10. pont). Ez a tartomány olyan széles, hogy a gátlás szigorú határértékeit nem lehet egyértelműen érvényességi kritériumként megszabni; ez akkor lesz lehetséges, amikor a fejlemények megmutatják, hogyan kell konzisztensebb oltóanyagot előállítani. A kontroll palackokban a 48 óra alatt termelt gáz térfogata 21 ml/g iszap szárazanyag és 149 ml/g között volt (átlagosan 72 ml/g). Nem volt egyértelmű összefüggés a termelt gáz mennyisége és a megfelelő EC_{50} érték között. A végső pH-érték 6,1 és 7,5 között változott.

41. A vizsgálat akkor tekinthető érvényesnek, ha 20 %-ot meghaladó gátlást kapnak a referencia kontrollban, amely 150 mg/l 3,5-diklór-fenolt tartalmaz, több mint 50 ml gáz per gramm száraz anyag keletkezik a vak kontrollban, és a pH-érték a vizsgálat végén a 6,2–7,5 tartományon belül van.

Mérési jegyzőkönyv

42. A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag

— közönséges név, kémiai név, CAS-szám, szerkezeti képlet és a releváns fizikai és kémiai tulajdonságok;

▼M6

— a vizsgált vegyi anyag kémiai tisztasága (szennyezettsége).

Vizsgálati körülmények

— a folyadéktartalmak és a fejterek térfogata a vizsgálati edényekben;

— a vizsgálati edények és a gázmérés leírása (pl. nyomásmérő típusa);

— a vizsgált vegyi anyag és a referencia-vegyianyag beadása a vizsgálati rendszerbe, az alkalmazott vizsgálati koncentrációk és a felhasznált oldószerek;

— az alkalmazott oltóanyag részletei: a szennyvíztisztító telep neve, a vizsgálat során kezelt szennyvíz forrásának leírása (pl. működési hőmérséklet, az iszap retenciós ideje, túlnyomórészt háztartási szennyvíz vagy ipari hulladék, stb.), a szilárd anyagok koncentrációja, az anaerob rothasztó gáztermelési aktivitása, korábbi kitettség vagy esetleges előzetes adaptáció mérgező vegyi anyagokhoz, illetve a sár, üledék gyűjtésének helye stb.;

— inkubációs hőmérséklet és idő;

— az ismétlések száma.

Eredmények

— pH-értékek a vizsgálat végén;

— adott esetben a vizsgálati, üres és referencia-vegyianyag kontroll edényekből gyűjtött összes mért adat (pl. a nyomás Pa-ban vagy millibarban), táblázatos formában;

— a százalékos gátlás a vizsgálati és referencia palackokban, és a gátlás-koncentráció görbék;

— az EC_{50}-értékek kiszámítása, mg/l és mg/g mértékegységben kifejezve;

— az 1 g iszapra jutó gáztermelés 48 óra alatt;

— a vizsgálati eredmények esetleges elvetésének oka,

— az eredmények megvitatása, beleértve az e vizsgálati módszertől való esetleges eltéréseket, a vizsgálati eredményekben a várható eredményektől az interferenciák és hibák miatt kialakuló esetleges eltérések megvitatása;

— ki kell térni arra is, hogy a vizsgálat célja a korábbi expozíciónak kitett vagy nem kitett mikroorganizmusokra gyakorolt toxicitás mérése volt-e.

IRODALOM

(1) E melléklet C.11. fejezete: Eleveniszap légzésgátló hatásának vizsgálata.

(2) E melléklet C.43. fejezete: Szerves vegyületek anaerob biológiai lebonthatósága rothasztott iszapban: a gáztermelés mérésén alapuló módszer.

(3) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (2003) ISO 13 641-1 Vízminőség. Az anaerob baktériumok gáztermelésének gátlása – 1. rész: Általános vizsgálat.

(4) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (2003) ISO 13 641-2 Vízminőség. Az anaerob baktériumok gáztermelésének gátlása – 2. rész: Az alacsony élőtömeg-koncentrációk vizsgálata.

(5) ISO (2000) Az ISO 13 641-1 és az ISO 13 641-2 körvizsgálata. Az anaerob baktériumaktivitás gátlásának meghatározása. 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.

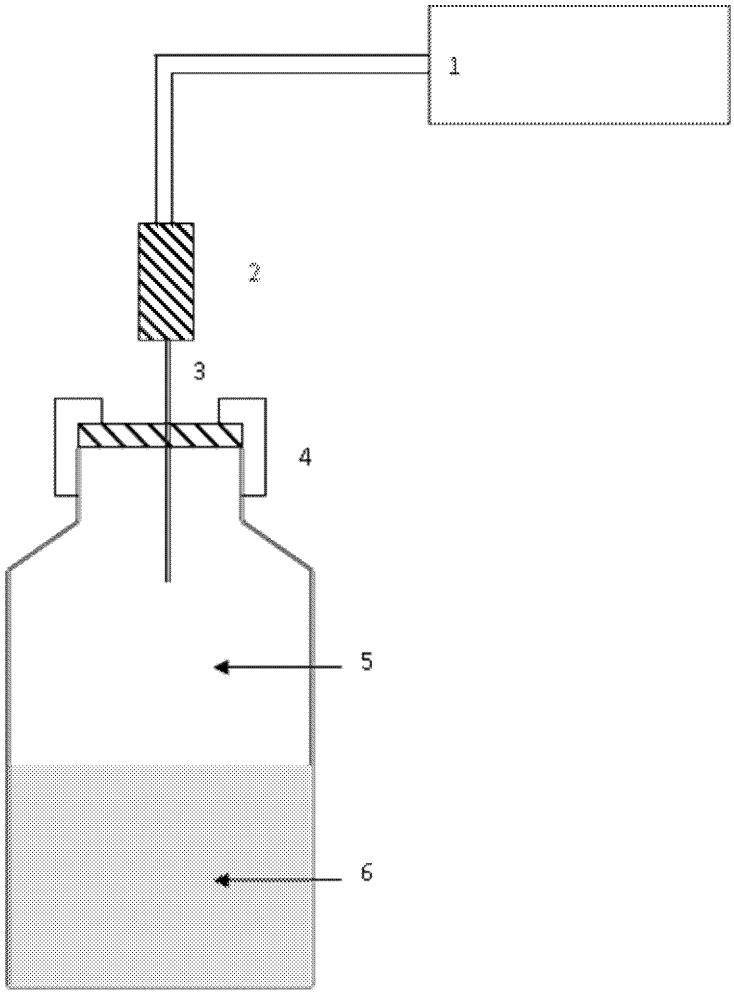
(12) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (1995) ISO 10 634 Vízminőség. Útmutató a vízben rosszul oldódó szerves vegyületek előkészítéséhez és kezeléséhez a vizes közegben történő biológiai lebomlásuk későbbi értékelése céljából.

(13) Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (1997) ISO 11 923 Vízminőség. A szuszpendált szilárd anyagok meghatározása üvegszálas szűrőn keresztül történő szűréssel.

▼**M6**

1. függelék

Példa a biogáztermelést a gáznyomás segítségével mérő készülékre



Jelmagyarázat:

1 – Nyomásmérő

2 – Háromutas légmentesen záró szelep

3 – Injekciós tű

4 – Légmentesen záró tömítéslezárás (peremezett sapka és szeptum)

5 – Fejtér

6 – Rothasztott iszap oltóanyag

Vizsgálati edények 35 °C ± 2 °C környezetben

▼M6

2. függelék

A nyomásmérés átszámítása

A nyomásmérőről leolvasott értékeket egy standard görbe segítségével összefüggésbe lehet hozni gázmennyiségekkel, és ebből ki lehet számítani az egy gramm száraz iszap által 48 óra alatt termelt gáz térfogatát. Ezt az aktivitási indexet a vizsgálati eredmények érvényességének vizsgálata során az egyik kritériumként használják. A kalibrációs görbét úgy állítják elő, hogy ismert mennyiségű gázt injektálnak 35 °C ± 2 °C hőmérsékleten a reakcióeleggyel megegyező térfogatú vizet tartalmazó szérumpalackokba, V_R;

— Adagoljon 35 °C ± 2 °C hőmérsékleten tartott V_R ml alikvot vizet öt szérumpalackba. Zárja le a palackokat és helyezze 35 °C ± 2 °C hőmérsékletű vízfürdőbe 1 óra időtartamra, hogy egyensúlyba kerüljenek;

— Kapcsolja be a nyomásmérőt, hagyja stabilizálódni, és állítsa nullára;

— Vezesse át a fecskendőtűt az egyik palack tömítésén, nyissa ki a szelepet, amíg a nyomásmérő nullát nem mutat, és zárja el a szelepet;

— Ezt az eljárást meg kell ismételni a többi palackkal is;

— Fecskendezzen 1 ml 35 °C ± 2 °C hőmérsékletű levegőt minden palackba. Szúrja át a tűt (a mérőn) az egyik palack tömítésén, és várja meg, amíg a nyomásérték stabilizálódik. Jegyezze fel a nyomást, nyissa ki a szelepet, amíg a nyomás nullát nem mutat, majd zárja el a szelepet;

— Ezt az eljárást meg kell ismételni a többi palackkal is;

— Ismételje meg a teljes eljárást 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml, és 50 ml levegő használatával;

— Vegye fel a beadott gázmennyiség (ml) függvényében ábrázolt nyomás (Pa) konverziós görbéjét. Az eszköz válasza lineáris a 0 Pa és 70 000 Pa közötti tartományban és 0–50 ml gáztermelés esetén.

▼M6

3. függelék

A hamis eredményekhez vezető tényezők meghatározása

a) *A palackkupakok minősége*

A szérumpalackokhoz különböző típusú szeptumok vannak kereskedelmi forgalomban; ezek közül vizsgálati körülmények között több – beleértve a butilgumit is – elveszíti a tömörségét tűvel való átszúrás esetén. Néha a nyomás nagyon lassan esik a szeptum injekciós tűvel való átszúrása után. A szivárgás megelőzése érdekében légmentesen záró szeptumok használata ajánlott (12. b) pont).

b) *Nedvesség az injekciós tűben*

Néha nedvesség gyűlik össze az injekciós tűben és a csövekben, amit enyhén negatív nyomásérték jelez. A helyzet megoldása érdekében húzza ki a tűt, rázza meg a csövet, törölje szárazra egy kendővel, és helyezzen fel egy új tűt (12. c) és 35. pont).

c) *Oxigénszennyeződés*

Az anaerob módszerek ki vannak kitéve az oxigénszennyeződés okozta hibáknak, ami csökkentheti a gáztermelést. Ebben az eljárásban ezt a lehetőséget szigorúan anaerob technikák használatával kell minimalizálni, ideértve a kesztyűs manipulátort.

d) *Nagyméretű szubsztrátumok az iszapban*

Az anaerob gáztermelést és az iszap érzékenységét befolyásolják a szubsztrátumok, amelyek az oltóanyaggal kerülnek át a vizsgálati palackokba. A háztartási anaerob rothasztókból származó rothasztott iszapok még gyakran tartalmaznak felismerhető anyagokat, például hajat és cellulóztartalmú növényi maradványokat, amelyek megnehezíthetik a reprezentatív mintavételt. Az iszap szitálásával a nagyméretű oldhatatlan anyagokat el lehet távolítani, ami valószínűbbé teszi a reprezentatív mintavételt (16).

e) *Illékony vizsgált vegyi anyagok*

Az illékony vizsgált vegyi anyagok meg fognak jelenni a vizsgálati palackok fejterében. Ez a vizsgált anyag egy részének a rendszerből való elvesztését eredményezheti a nyomásmérés utáni szellőztetés alatt, így tévesen magas EC_{50}-értékek adódhatnak. A fejtértérfogat és a folyadéktérfogat arányának megfelelő megválasztásával, valamint a nyomásmérés utáni szellőztetés elhagyásával a hiba csökkenthető (10).

f) *Nem lineáris gáztermelés*

Ha az inkubációs idő függvényében ábrázolt átlagos kumulatív gáztermelés közelítőleg nem lineáris a 48 órás időtartam alatt, a vizsgálat pontossága csökkenhet. Ennek kezelése érdekében tanácsos lehet másik forrásból származó rothasztott iszapot használni és/vagy a vizsgálati szubsztrátum (tápleves, élesztőkivonat és glükóz) megnövelt koncentrációját hozzáadni (29).

▼M6

4. függelék

Alkalmazás alacsony élőanyag-koncentrációjú környezeti minták esetén – anaerob sarak, üledékek, stb.

BEVEZETÉS

A.1. A természetben előforduló anaerob sarak, üledékek, talajok, stb. fajlagos mikrobiális aktivitása (az egy gramm száraz szilárd anyag által termelt gáz térfogata) általában sokkal alacsonyabb, mint a szennyvízből származó anaerob iszapoké. Emiatt amikor vegyi anyagoknak az ilyen kevésbé aktív mintákra kifejtett gátló hatását kell mérni, bizonyos kísérleti feltételeket módosítani kell. Az ilyen kevésbé aktív minták esetén két általános eljárás lehetséges:

a) Végezzen módosított előzetes vizsgálatot (25. pont) a hígítatlan sár, talaj, stb. mintával 35 °C ± 2 °C hőmérsékleten vagy a mintagyűjtés helyén tapasztalt hőmérsékleten a pontosabb modellezés érdekében (mint az ISO 13 641 szabvány 1. részében);

b) Vagy végezze el a vizsgálatot hígított (1:100) rothasztó iszappal a környezeti mintától várható alacsony aktivitás modellezése érdekében, de a hőmérsékletet 35 °C ± 2 °C értéken tartva (mint az ISO 13 641 szabvány 2. részében).

A.2. Az a) opciót az itt leírt módszer szerint lehet megvalósítani (egyenértékű az ISO 13 641 szabvány 1. részével), de előzetes vizsgálatot kell végezni (25. pont) az optimális körülmények megállapítására, kivéve, ha ezek a korábbi vizsgálatokból már ismertek. A sár- vagy üledékmintát alaposan össze kell keverni, pl. turmixgépben, és ha szükséges, kis mennyiségű levegőtlenített hígítóvízzel (14) fel kell hígítani úgy, hogy elegendő mértékben mobil legyen ahhoz, hogy át lehessen vinni egy durva végű pipettával vagy mérőhengerrel. Ha úgy vélik, hogy egyes tápanyagok hiányozhatnak, a sármintát le lehet centrifugálni (anaerob körülmények között) és újra lehet szuszpendálni élesztő kivonatot tartalmazó ásványi közegben (A.11).

A.3. b) opció. Ez a módszer nagyjából utánozza a környezeti minták alacsony aktivitását, de hiányzik belőle ezeknek a mintáknak a magas szuszpendált szilárd anyag koncentrációja. Ezeknek a szilárd anyagoknak a gátlásban betöltött szerepe nem ismert, de lehetséges, hogy a vizsgált vegyi anyagok és a sár összetevői közötti reakció, illetve a vizsgált vegyi anyagoknak a szilárd anyagokhoz történő adszorpciója a vizsgált vegyi anyag toxicitásának csökkenését eredményezheti.

A.4. A hőmérséklet szintén fontos tényező: a pontos modellezés érdekében a vizsgálatokat a mintavétel helyszínén uralkodó hőmérsékleten kell elvégezni, hiszen a metántermelő baktériumok különböző csoportjairól ismert, hogy különböző hőmérsékleti tartományokban működnek, azaz vannak termofilek (~30–35 °C), mezofilek (20–25 °C) és pszichrofilek (<20 °C), amelyek különböző gátlási mintákat mutathatnak.

A.5. Időtartam. A hígítatlan iszapot használó általános vizsgálatban (1. rész) a 2–4 nap alatti gáztermelés mindig elegendő volt, míg a 2. részben a századrészére hígított iszap elégtelen gázt termelt – ha termelt egyáltalán – ez alatt az időszak alatt a körvizsgálatban. Madsen és munkatársai (1996) ez utóbbi vizsgálat leírásában legalább 7 napot tartanak kívánatosnak.

Vizsgálat alacsony élőanyag-koncentrációval (b. opció)

Az alábbi változásokat és módosításokat kell végrehajtani, kiegészítve vagy helyettesítve a fő szöveg néhány meglévő pontját és alpontját.

▼**M6**

A.6. A 6. pont a következőkkel egészül ki: A vizsgálat elve;

„Ez a technika 1:100 arányban hígított anaerob iszappal használható, részben azért, hogy modellezze a sarak és üledékek alacsony aktivitását. Az inkubációs hőmérséklet lehet 35 °C, vagy az a hőmérséklet, amely a mintavétel helyszínén uralkodik. Mivel a bakteriális aktivitás sokkal kisebb mértékű, mint a hígítatlan iszapban, az inkubációs időt legalább 7 napra kell növelni.”

A.7. A 12. a) pont a következőkkel egészül ki:

„az inkubátornak alkalmasnak kell lennie arra, hogy 15 °C alsó hőmérsékletig működjön.”

A.8. A 13. pont után a szöveg egy extra reagenssel egészül ki:

„Foszforsav (H_3PO_4), 85 tömeg % vízben.”

A.9. A 16. pont vége a következőkkel egészül ki:

„Használjon 0,20 ± 0,05 g/l összes száraz szilárd anyag végső koncentrációt a vizsgálatban.”

A.10. 17. pont Vizsgálati szubsztrátum

Ezt szubsztrátumot nem lehet használni, a helyébe egy élesztőkivonat lép (lásd a 17. pontot; A.11, A.12, A.13).

A.11. Egy nyomelemeket is tartalmazó ásványi közegre van szükség az anaerob iszap hígításához, és az egyszerűség kedvéért a szerves szubsztrátumot – az élesztőkivonatot – is hozzáadják ehhez a közeghez.

A (17) pont után a szöveg a következőkkel egészül ki:

„a) Vizsgálati ásványi közeg, élesztőkivonattal.

Ezt 10-szeres töménységű vizsgálati közegből (17. b) pont; A.12) állítják elő egy nyomelemoldattal (17. c) pont; A.13). Használjon frissen beszerzett nátrium-szulfid nonahidrátot (17. b) pont; A.12), vagy mossa és szárítsa meg használat előtt, hogy elegendő redukciós kapacitása legyen. Ha a vizsgálatot kesztyűs manipulátor (12. j) pont) nélkül végzik, a nátrium-szulfid koncentrációját a törzsoldatban 2 g/l értékre kell növelni (1 g/l-ről). A nátrium-szulfidot egy megfelelő törzsoldatból is hozzá lehet adni a zárt vizsgálati palackok szeptumán keresztül (ez az eljárás csökkenti az oxidáció kockázatát), hogy 0,2 g/l végső koncentrációt kapjunk. Alternatív megoldásként titán(III)-citrát (17. b) pont) is alkalmazható. Adja be a zárt vizsgálati palackok szeptumán keresztül 0,8–1,0 mmol/l végső koncentrációban. A titán(III)-citrát egy rendkívül hatékony és alacsony toxicitású redukáló szer, amely a következőképpen állítható elő: Oldjon fel 2,94 g trinátrium-citrát-dihidrátot 50 ml oxigénmentes hígítóvízben (14. pont) (ami 200 mmol/l oldatot eredményez), és adjon hozzá 5 ml titán(III)-klorid oldatot (15 g/100 ml hígítóvíz). Semlegesítse pH 7 ± 0,5 értékre nátrium-karbonáttal, és adja hozzá egy megfelelő szérumpalackhoz áramló nitrogéngáz alatt. A titán(III)-citrát koncentrációja ebben törzsoldatban 164 mmol/l. A vizsgálati közeget azonnal használja fel vagy 4 °C-on tárolja legfeljebb 1 napig.

A.12. b) Tízszeresére koncentrált vizsgálati közeg, amely a következő anyagokkal készíthető:

vízmentes kálium-dihidrogén-foszfát (KH_2PO_4)	2,7 g
dinátrium-hidrogénfoszfát (Na_2HPO_4)	4,4 g
(vagy 11,2 g dodekahidrát)	5,3 g
ammónium-klorid (NH_4Cl)	

▼**M6**

kalcium-klorid-dihidrát ($CaC1_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
magnézium-szulfát-heptahidrát ($MgSO_2 \cdot 7H_2O$)	1,0 g
vas(II)-klorid-tetrahidrát ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
rezazurin (redox indikátor)	0,01 g
nátrium-szulfid-nonahidrát ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
(vagy titán(III)-citrát) végső koncentráció	0,8–1,0 mmol/l
nyomelemoldat (lásd a 17. c) pontot; A.13)	10,0 ml
élesztőkivonat	100 g
Oldjuk fel hígítóvízben (14. pont), és egészítse ki:	1 000 ml

A.13. c) Nyomelemoldat, amely a következő anyagokkal készíthető:

mangán(II)-klorid-tetrahidrát ($MnCl_2.4H_2O$)	0,5 g
ortobórsav (H_3BO_3)	0,05 g
cink-klorid ($ZnCl_2$)	0,05 g
réz(II)-klorid ($CuCl_2$)	0,03 g
nátrium-molibdát-dihidrát ($Na_2MoO_4.9H_2O$)	0,01 g
kobalt(II)-klorid-hexahidrát ($CoCl_2$, $6H_2O$)	1,0 g
nikkel(II)-klorid-hexahidrát ($NiCl_2$, $6H_2O$)	0,1 g
dinátrium-szelenit (Na_2SeO_3)	0,05 g
Oldjuk fel hígítóvízben (14. pont), és egészítse ki:	1 000 ml”

A.14. 25. pont: Előzetes vizsgálat

Alapvető fontosságú, hogy az előzetes vizsgálatot a 24. pontban leírtak szerint végezzék el, kivéve, hogy az iszap szilárd anyag koncentrációja egy százada legyen a megadott koncentrációknak, azaz 0,1 g/l, 0,2 g/l és 0,4 g/l. Az inkubálás időtartama legyen legalább 7 nap.

Megjegyzés: A körvizsgálatban (5) a gáztér térfogata túl magas volt (a teljes térfogat 75 %-a); az ajánlott tartományban (10–40 %) kell lennie. A döntő szempont az, hogy a körülbelül 80 %-os gátlásnál termelt gáz mennyisége elfogadható pontossággal mérhető legyen (pl. ± 5–10 %).

A.15. 26–30. pont: A vizsgált vegyi anyag, az oltóanyag és a szubsztrátum hozzáadása.

A hozzáadás az e pontokban leírt módon történik, de a szubsztrátumoldatot (17. pont) a vizsgálati közeg plusz élesztőkivonat szubsztrátum váltja fel (A.11).

Továbbá, az iszap száraz szilárd anyagainak végső koncentrációja 2–4 g/l-ről 0,2 ± 0,05 g/l-re csökken (A.9). Az A.1 táblázat – amely a 29. pontban található táblázat helyébe lép – megad két példát a komponensek vizsgálati keverékhez való hozzáadására.

A.16. 33. pont: A palackok inkubálása

A várható alacsonyabb mértékű gáztermelés miatt az inkubáció legalább 7 napig tart.

▼**M6**

A.17. 34. pont: Nyomásmérés

A 34. pontban leírttal megegyező eljárást használják a palackok fejterében lévő nyomás mérésére, ha a gázfázisban lévő mennyiségek meghatározására van szükség. Ha a CO_2 és a CH_4 összesített mennyiségét kell mérni, a folyékony fázis pH-ját körülbelül pH = 2-re csökkentik úgy, hogy H_3PO_4-at injektálnak minden releváns palackba, és a vizsgálati hőmérsékleten történő 30 perces rázás után megmérik a nyomást. Több információt lehet azonban kapni az inokulum minőségéről, ha minden palackban megmérik a nyomást a savasítás előtt és után. Például amikor a CO2-termelés aránya sokkal nagyobb, mint a metántermelésé, a vizsgált anyag megváltoztathatja a fermentáló baktériumok érzékenységét és/vagy előnyösen befolyásolhatja a metanogén baktériumokat.

A.18. 36. pont: pH-mérés

Ha H_3PO_4-at kell használni, néhány extra palackot kell létrehozni a pH-mérés céljára, amelyekhez nem adnak H_3PO_4-at.

Hivatkozás:

Madsen, T, Rasmussen, HB; and Nilsson, L (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhagen.

A.1 táblázat

Példák a vizsgálati tételek összeállítására

A reakcióelegy összetevői	1. példa	2. példa	Normális hozzáadási sorrend
Az elkészített oltóanyag koncentrációja (g/l)	0,42	2,1	-
A hozzáadott oltóanyag térfogata (ml)	45	9	4
Az oltóanyag koncentrációja a vizsgálati palackokban (g/l)	0,20	0,20	—
A hozzáadott vizsgálati közeg térfogata (ml)	9	9	2
A hozzáadott hígítóvíz térfogata (ml)	36	72	3
Az élesztőkivonat koncentrációja a vizsgálati palackokban (g/l)	9,7	9,7	—
A vizsgált vegyi anyag törzsoldatának térfogata (ml)	3	3	1
Összes folyadéktérfogat (ml)	93	93	-

▼**M6**

5. függelék

Fogalommeghatározások

E vizsgálati módszer alkalmazásában a következő fogalommeghatározások alkalmazandók:

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼M6

C.35. ÜLEDÉKBEN ÉS VÍZBEN ÉLŐ *LUMBRICULUS* TOXICITÁSI VIZSGÁLATA SZENNYEZETT ÜLEDÉKBEN

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 225. vizsgálati iránymutatásában (2007) leírt módszerrel. Az üledékfogyasztó endobentikus állatok potenciálisan nagymértékben ki vannak téve az üledékben kötött vegyi anyagoknak és ezért kiemelt figyelemben kell ezeket részesíteni, pl. (1), (2), (3). Ezek közül az üledékfogyasztók közül a vízi oligochaeták fontos szerepet játszanak a vízi rendszerek üledékeiben. Az üledék bioturbációja révén és a ragadozók zsákmányállataként ezek az állatok nagy hatással lehetnek az ilyen vegyi anyagok más élőlények, például bentivor halak számára való biológiai elérhetőségére. Az epibentikus szervezetekkel szemben az endobentikus vízi oligochaeták (pl. Lumbriculus variegatus) beássák magukat az üledékbe, és az üledék felszíne alatt fogyasztják az üledékrészecskéket. Ez minden lehetséges felvételi útvonalon keresztül biztosítja a vizsgált szervezetek expozícióját a vizsgált anyaggal szemben (pl. érintkezés, szennyezett üledékrészecskék lenyelése, de a pórusvízen és a fedővízen keresztül is).

2. E vizsgálati módszer célja, hogy értékelje az endobentikus oligochaeta Lumbriculus variegatus (Müller) üledékkel kapcsolatba hozható vegyi anyagokkal való tartós expozíciójának hatását. A módszer a meglévő üledéktoxicitási és bioakkumulációs vizsgálati protokollokon alapul, pl. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). A módszert statikus tesztelési körülményekhez írták le. Az e vizsgálati módszerben alkalmazott expozíciós forgatókönyv az üledék szennyezése a vizsgált anyaggal. A szennyezett üledék hivatott modellezni a vizsgált vegyi anyaggal szennyezett üledéket.

3. A vegyi anyagok, amelyek üledéklakó szervezetekre gyakorolt hatását vizsgálni kell, általában hosszú ideig maradnak ebben a környezetben. Az üledéklakó szervezetek többféle módon lehetnek kitéve ezeknek az anyagoknak. Az egyes expozíciós útvonalak viszonylagos fontossága és a teljes toxikus hatás egyes expozíciós útvonalaknak tulajdonítható részének kialakulásához szükséges időtartam az érintett vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól és az állatban bekövetkező végső sorsától függ. Az erősen adszorbeálódó (például log K_{ow} > 5) vagy az üledékbe kovalens kötéssel beépülő anyagok esetében fontos expozíciós útvonal lehet a szennyezet táplálék elfogyasztása. Annak érdekében, hogy ne becsüljék alá az ilyen vegyi anyagok toxicitását, a vizsgált szervezetek szaporodásához és növekedéséhez szükséges táplálékot a vizsgált vegyi anyag alkalmazása előtt adják hozzá az üledékhez (11). A leírt vizsgálati módszer a vizsgálat elvégzéséhez kellően részletes, de egyúttal lehetővé teszi a kísérleti terv kiigazítását is az egyes laboratóriumok körülményeitől és a vizsgált vegyi anyagok változatos jellemzőitől függően.

4. A vizsgálati módszer célja, hogy meghatározza a vizsgált vegyi anyagnak a vizsgált szervezetek szaporodására és élőanyagtömegére kifejtett hatásait. A mért biológiai paraméterek az összes túlélő féreg száma és az élőanyagtömeg (száraz tömeg) az expozíció végén. Ezeket az adatokat vagy regressziós modell használatával elemzik az x % hatást okozó koncentráció (pl. EC_{50}, EC_{25}, és EC_{10}) becslése érdekében, vagy statisztikai hipotézisvizsgálattal, hogy meghatározzák az észlelhető hatást még nem okozó koncentrációt (NOEC) és az észlelhető hatást okozó legkisebb koncentrációt (LOEC).

5. E melléklet „Árvaszúnyogok életciklusára ható toxicitás vizsgálata üledék-víz rendszerben, szennyezett üledék használatával” című C.27. fejezete (6) sok lényeges és hasznos adatot nyújt a bemutatott üledék toxicitási vizsgálati módszer teljesítményével kapcsolatban. Ezért e dokumentum alapján dolgozták ki azokat a módosításokat, amelyek az üledék toxicitási vizsgálat Lumbriculus variegatus fajjal való elvégzéséhez voltak szükségesek. További hivatkozott dokumentumok például az ASTM Szabványos iránymutatás az üledékekhez kapcsolódó szennyeződések fenéklakó gerinctelenekben való bioakkumulációjának meghatározására c. kiadványa (3), az

▼M6

US EPA Módszerek az üledékekhez kapcsolódó szennyeződések toxicitásának és bioakkumulációjának édesvízi gerinctelenekben történő mérésére c. kiadványa (7), valamint az ASTM Iránymutatás az üledékek toxikológiai vizsgálat céljából történő gyűjtéséhez, tárolásához, jellemzéséhez és feldolgozásához, valamint a fenéklakó gerinctelenek gyűjtésére használt mintavevők kiválasztásához (12). Emellett a vizsgálati módszer körvizsgálata során szerzett gyakorlati tapasztalatok ((13), körvizsgálati jelentés) és a szakirodalmi adatok is fő információforrásként szolgáltak e dokumentum elkészítése során.

ELŐFELTÉTELEK ÉS IRÁNYMUTATÓ INFORMÁCIÓK

6. A vizsgált vegyi anyagra vonatkozó információkat (például a biztonsági előírásokat, a megfelelő tárolási körülményeket és az analitikai módszereket) a vizsgálat megkezdése előtt össze kell gyűjteni. A vizsgálat elvégzését megnehezítő fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkező vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozóan a (14) szakirodalom nyújt további tájékoztatást.

7. Az alábbi információkat kell ismerni a vizsgált vegyi anyagról a vizsgálat elvégzése előtt:

   — közönséges név, kémiai név (lehetőleg az IUPAC név), szerkezeti képlet, CAS nyilvántartási szám, tisztaság;

   — gőznyomás;

   — oldhatóság vízben;

8. A következő kiegészítő információkat hasznosnak tekintik a vizsgálat megkezdése előtt:

   — oktanol-víz megoszlási hányados (K_{ow});

   — szerves szén-víz megoszlási hányados, K_{oc} formában kifejezve;

   — hidrolízis;

   — fototranszformáció vízben;

   — biológiai lebonthatóság;

   — felületi feszültség.

9. Az alkalmazandó üledék bizonyos jellemzőire vonatkozó információkat a vizsgálat kezdete előtt be kell szerezni (7). A részleteket lásd a 22–25. pontban;

A VIZSGÁLAT ELVE

10. Hasonló fiziológiai állapotú (az 5. függelékben leírtak szerint szinkronizált) férgeket tesznek ki egy mérgező anyag olyan koncentrációsorozatának, amelyet az üledék-víz rendszer üledékfázisán alkalmaznak. Közegként mesterséges üledéket és mesterséges vizet kell használni. A vizsgálati edények, amelyekhez nem adnak a vizsgált vegyi anyagot, kontrollként szolgálnak. Az üledéket ömlesztve szennyezik be a vizsgált vegyi anyaggal minden koncentrációszint esetében, hogy lecsökkentsék az egyes koncentrációk ismétlései közötti variabilitást, és a vizsgált szervezeteket ezt követően viszik be a vizsgálati edényekbe, amelyekben az üledék- és vízkoncentrációkat egyensúlyba hozták (lásd a 29. pontot). A vizsgálati állatok 28 napig vannak kitéve az üledék-víz rendszereknek. Tekintettel a mesterséges üledék alacsony tápanyagtartalmára, az üledéket ki kell egészíteni egy táplálékforrással (lásd a 22–23. pontot és a 4. mellékletet) annak érdekében, hogy a férgek növekedjenek és szaporodjanak a kontroll körülmények között. Ily módon biztosítható, hogy a vizsgált állatok ki legyenek téve a vegyi anyagnak a vízben és az üledékben, valamint a táplálékon keresztül is.

11. Az ilyen típusú vizsgálatok preferált végpontja az EC_x (például EC_{50}, EC_{25} és EC_{10}; hatáskoncentráció, amely a vizsgálati szervezetek x %-át érinti) a reprodukcióra és az élőanyagtömegre, a kontrollal összehasonlítva. Meg kell azonban jegyezni, hogy figyelembe véve a rendkívül magas 95 %-os megbízhatósági határokkal rendelkező (pl. (15)) alacsony EC_x (például EC_{10}, EC_{25}) értékek magas bizonytalanságát és a hipotézisvizsgálat során

▼M6

számított statisztikai erőt, az EC_{50} tekinthető a legerősebb végpontnak. Ezen kívül az észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC) és az észlelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC) kiszámítható az élőanyagtömegre és a szaporodásra, ha a vizsgálati elrendezés és az adatok támogatják ezeket a számításokat (lásd a 34–38. pontot). A vizsgálat célja, vagyis hogy az EC_x vagy a NOEC értékét akárják-e kiszámítani, meghatározza a vizsgálati elrendezést.

REFERENCIA VIZSGÁLAT

12. A kontroll szervezetek teljesítménye várhatóan kellőképpen demonstrálja a laboratóriumi képességét a vizsgálat elvégzésére, és ha rendelkezésre állnak történeti adatok, a vizsgálat megismételhetőségét is. Ezen túlmenően, rendszeres időközönként referencia toxicitási vizsgálatokat lehet végezni egy referencia toxikus anyag használatával a vizsgálati szervezetek érzékenységének értékelése céljából. A vízben végzett 96 órás referencia toxikológiai vizsgálatok csak a vizsgált állatok érzékenységének és állapotának megfelelő demonstrálására lehetnek alkalmasak (4) (7). A pentaklorofenol (PCP) teljes vizsgálatban (28 napos expozíció szennyezett üledékben) mutatott toxicitására vonatkozó információt a 6. függelék és a vizsgálati módszer körvizsgálatáról készített jelentés tartalmazza (13). A PCP akut, csak vízi toxicitását pl. a (16) irodalom írja le. Ez az információ a vizsgálati organizmusok érzékenységének összehasonlítására használható a referencia toxikus anyagként PCP-t használó referencia vizsgálatokban. A kálium-kloridot (KCl) és a réz-szulfátot ($CuSO_4$) is javasolták referencia toxikus anyagként az L. variegatus fajjal végzett vizsgálatokhoz (4) (7). A mai napig bonyolult a KCl-re vonatkozó minőségi kritériumok meghatározása a toxicitási adatok alapján, mivel hiányoznak a szakirodalmi adatok a L. variegatus fajjal kapcsolatban. A réz L. variegatus fajra kifejtett toxicitására vonatkozó információ megtalálható a (17)–(21) szakirodalmi hivatkozásban.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

13. A vizsgálat érvényességéhez a következő követelményeknek kell teljesülniük:

— A körvizsgálat (13) kimutatta, hogy a Lumbriculus variegatus esetében a kontrollokban az élő férgek ismétlésenkénti átlagos számának legalább 1,8-as faktorral kell magasabbnak lennie az expozíció végén a férgek expozíció kezdetén tapasztalt ismétlésenkénti számához viszonyítva.

— A fedővíz pH értékének 6 és 9 között kell lennie az egész vizsgálat során.

— A fedővíz oxigénkoncentrációja nem lehet kisebb, mint a levegő telítettségi érték (ASV) 30 %-a a vizsgálati hőmérsékleten a vizsgálat időtartama alatt.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Vizsgálati elrendezés

14. A fedővíz megújítása nélküli statikus rendszerek használata javasolt. Ha az üledék-víz arány (lásd a 15. pontot) megfelelő, a gyenge levegőztetés általában elegendő, hogy a víz minősége elfogadható szinten maradjon a vizsgálati szervezetek számára (pl. maximalizálja az oldott oxigén szintjét, minimalizálja a kiválasztási termékek felgyülemlését). A fedővíz szakaszos vagy folyamatos megújításával járó félstatikus vagy állandó áramlású rendszerek csak kivételes esetekben alkalmazhatók, mivel a fedővíz rendszeres megújítása várhatóan befolyásolja a kémiai egyensúlyt (pl. vizsgált vegyi anyag veszteség a vizsgálati rendszerből).

Vizsgálati edények és készülékek

15. Az expozíciót pl. 250 ml-es űrtartalmú és 6 cm átmérőjű üveglombikokban kell végezni. Amennyiben az üledék és a fedővíz megfelelő mélysége biztosított, ettől eltérő üvegedények is alkalmazhatók. Minden edénynek egy kb.

▼M6

1,5–3 cm mélységű formulázott üledékréteget kell kapnia. Az üledékréteg és a fedővíz mélységének aránya 1:4 legyen. Az edények a betelepítési aránynak – azaz az üledék egy tömegegységére jutó vizsgálati férgek számának – megfelelő térfogatúak legyenek (lásd még a 39. pontot).

16. A vizsgálati oldatokkal érintkezésbe kerülő vizsgálati edényeknek és egyéb készülékeknek teljes mértékben üvegből vagy más, kémiailag inert anyagból kell készülniük. A berendezés valamennyi részét illetően kerülni kell az olyan anyagok használatát, amelyek oldódhatnak, adszorbeálhatják a vizsgált vegyi anyagot, vagy amelyekből más vegyi anyagok mosódhatnak ki, és ártalmasak lehetnek a vizsgálathoz használt állatokra. Politetrafluoroetilént (PTFE), rozsdamentes acélt és/vagy üveget kell használni azokban a berendezésekben, amelyek érintkeznek a vizsgálati közeggel. Az üvegbe közismerten felszívódó szerves vegyi anyagok esetében szilanizált üveg használata szükséges. Ilyen esetekben a felszerelést használat után el kell dobni.

A vizsgálathoz használt fajok

17. Az ilyen típusú vizsgálatokban használt faj az édesvízi oligochaeta Lumbriculus variegatus (Müller). Ez a faj sokféle üledéktípust tolerál, és széles körben használják az üledékek toxicitási és bioakkumulációs vizsgálataihoz [pl. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. A vizsgálathoz használt állatok beszerzési forrását, a faj azonosságának igazolását (pl. (36)), valamint a tenyésztési körülményeket jegyzőkönyvezni kell. A fajmeghatározást nem szükséges minden vizsgálat előtt elvégezni, ha a példányok saját tenyészetből származnak.

A vizsgálathoz használt organizmusok tenyésztése

18. Annak érdekében, hogy elegendő számú féreg álljon rendelkezésre az üledék toxicitási vizsgálatok lefolytatásához, a férgeket célszerű állandó laboratóriumi tenyészetben tartani. A Lumbriculus variegatus laboratóriumi tenyésztési módszereivel kapcsolatos iránymutatás és a starterkultúrák beszerzési forrásai az 5. függelékben találhatók. A faj tenyésztésének részleteit lásd a (3), (7) és (27) szakirodalmi hivatkozásban.

19. Annak biztosítása érdekében, hogy a vizsgálatot ugyanazon fajhoz tartozó állatokkal végezzék, erősen ajánlott egyetlen fajból álló tenyészeteket létesíteni. Győződjön meg arról, hogy a tenyészetek és különösen a vizsgálatok során felhasznált férgek mentesek a látható betegségektől és rendellenességektől.

Víz

20. Az e melléklet C.1. fejezete szerinti mesterséges víz (37) használata ajánlott fedővízként a vizsgálatokban; ezt a vizet a férgek laboratóriumi tenyészeteiben is lehet használni (elkészítését lásd a 2. függelékben). Ha szükséges, a természetes víz használható. A vizsgálathoz olyan minőségű vizet kell választani, amely lehetővé teszi a vizsgálathoz használt faj növekedését és szaporodását az alkalmazkodási és a vizsgálati időszakok alatt anélkül, hogy rendellenes külső megjelenést vagy viselkedést mutatnának. A Lumbriculus variegatus fajról kimutatták, hogy túlél, növekszik és szaporodik az ilyen típusú vízben (30), és biztosított a vizsgálati és tenyésztési körülmények maximális szabványosítása. Ha a mesterséges vizet használnak, annak összetételét jegyzőkönyvezni kell, és a vizet használat előtt legalább a pH, az oxigéntartalom, és a keménység (CaCO3 mg/l formájában kifejezve) tekintetében jellemezni kell. A víz használat előtt elemzése mikroszkopikus szennyező anyagokra hasznos információkat nyújthat (lásd például a 3. függeléket).

21. A fedővíz pH-értékének a 6,0–9,0 tartományban kell lennie (lásd a 13. pontot). Ha fokozott ammóniaképződés várható, hasznosnak tekintik a pH 6,0 és 8,0 között tartását. Például gyenge szerves savak vizsgálata esetén ajánlatos a pH-t a vizsgálat során használandó víz pufferelésével beállítani, pl. a (16) szakirodalmi hivatkozásban leírtak szerint. A vizsgálathoz használandó víz teljes keménységének 90–300 mg $CaCO_3$/liter természetes víz között kell lennie. A 3. függelék összefoglalja az elfogadható hígítóvíz további kritériumait az OECD 210. iránymutatása szerint (38).

▼M6

Üledék

22. Mivel nem biztos, hogy az egy meghatározott forrásból származó nem szennyezett természetes üledékek egész évben rendelkezésre állnak, illetve az őshonos élőlények, valamint a mikroszennyezők jelenléte befolyásolhatja a vizsgálatot, formulázott üledék (más néven rekonstituált, mesterséges vagy szintetikus üledék) használata ajánlott. A formulázott üledék használata minimalizálja a vizsgálati feltételek változékonyságát, valamint az őshonos fauna bejutásának veszélyét. A következő formulázott üledék a (6), (39) és (40) szerinti mesterséges üledéken alapul. Használata ajánlott az ilyen típusú vizsgálatokban ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):

a) 4–5 % (száraz tömeg) tőzegmoha; fontos, hogy a tőzeget por formában kell használni, lebomlás foka: „közepes”, finomra őrölt (szemcseméret ≤ 0,5 mm), csak levegőn szárított.

b) 20 ± 1 % (száraz tömeg) kaolinagyag (lehetőleg 30 % feletti kaolinittartalommal).

c) 75–76 % (száraz tömeg) kvarchomok (finom homok, szemcseméret: ≤ 2 mm, de a részecskék több mint 50 százaléka a 50–200 μm tartományban legyen).

d) Ionmentesített víz, az üledék száraz tömeg 30–50 %-a, a száraz üledékkomponenseken felül.

e) A végtermékként kapott üledékkeverék pH-jának beállításához szükséges mennyiségű vegytiszta minőségű kalcium-karbonátot (CaCO3) adnak hozzá.

f) A végtermékként kapott keveréknek 2 % (± 0,5 %) szerves széntartalommal (TOC) kell rendelkeznie az üledék száraz tömegéhez viszonyítva, amelyet az a) és c) pont szerinti megfelelő mennyiségű tőzeg és homok hozzáadásával kell beállítani.

g) Táplálék, pl. a nagy csalán (Urtica sp., a gyógyszertári szabványoknak megfelelően, emberi fogyasztásra) porított levelei, vagy az Urtica sp. porított levelei és alfa-cellulóz keveréke (1:1), az üledék száraz tömegének 0,4–0,5 %-ában, a száraz üledékkomponenseken felül; a részleteket lásd a 4. függelékben.

23. A tőzeg, kaolin agyag, táplálékanyagok és homok beszerzési forrását ismerni kell. A g) ponton kívül e melléklet C.27. fejezete (6) felsorolja az alternatív táplálékforrásként használandó növényi anyagokat: dehidratált eperfa (*Morus alba*), fehér lóhere (*Trifolium repens*), spenót (*Spinacia oleracea*) levelek, vagy gabonafű.

24. A kiválasztott táplálékforrást az üledék vizsgált vegyi anyaggal történő szennyezése előtt vagy alatt kell hozzáadni. A kiválasztott táplálékforrásnak legalább elfogadható mértékű szaporodást kell lehetővé tennie a kontrollokban. A mesterséges üledékben vagy összetevőiben található mikroszennyező anyagok felhasználás előtti analízise hasznos információkkal szolgáltathat. A formulázott üledék elkészítésének egy példáját a 4. függelék mutatja be. Száraz összetevők keverése is elfogadott, amennyiben bizonyítható, hogy a fedővíz hozzáadását követően az üledék nem esik szét összetevőire (például a vízben lebegő tőzegrészecskékre), és a tőzeget vagy az üledéket megfelelően kondicionálták (lásd még a 25. pontot és a 4. függeléket). A mesterséges üledéket legalább az összetevők eredete, a szemcseméret eloszlása (homok, iszap és agyag százaléka), az összes szerves szén tartalom (TOC), a víztartalom és a pH tekintetében jellemezni kell. A redoxpotenciál mérése opcionális.

25. Ha szükséges, például specifikus vizsgálatok céljából, nem szennyezett területekről származó természetes üledékek is szolgálhatnak vizsgálati és/vagy tenyésztő üledékként (3). Ha azonban természetes üledéket alkalmaznak,

▼M6

akkor azt legalább az eredetével (a gyűjtés helye), a pórusvíz pH-értékével és ammóniatartalmával, összes szerves szén tartalmával (TOC) és nitrogéntartalmával, részecskeméret-eloszlásával (homok, iszap, és agyag százaléka), valamint százalékos víztartalmával kell jellemezni (7), és mentesnek kell lennie mindennemű szennyeződéstől és egyéb élőlényektől, amelyek versenyezhetnek a vizsgált szervezetekkel vagy elfogyaszthatják azokat. A redoxpotenciál és a kationcserélő kapacitás mérése opcionális. Az vizsgált vegyi anyaggal történő szennyezés előtt ajánlott továbbá a természetes üledéket az elkövetkező vizsgálat során uralkodókkal megegyező körülmények között hét napon keresztül kondicionálni. E kondicionáló időszak végén a fedővizet el kell távolítani és ki kell önteni.

26. A vizsgálathoz olyan minőségű üledéket kell használni, amely lehetővé teszi a kontroll organizmusok túlélését és szaporodását az expozíciós időszak alatt anélkül, hogy rendellenes külső megjelenést vagy viselkedést mutatnának. A kontroll férgeknek be kell ásniuk magokat az üledékbe, és el kell fogyasztaniuk az üledéket. A kontrollok szaporodásának meg kellene felelnie legalább a 13. pontban leírt érvényességi feltételeknek. A székletpelletek jelenlétét vagy hiányát az üledék felszínén – ami azt jelzi, hogy az üledéket a férgek elfogyasztották-e – fel kell jegyezni, mert ez az információ hasznos lehet a vizsgálati eredmények expozíciós útvonal tekintetében való értelmezése során. Az üledék elfogyasztásával kapcsolatos további információkat lehet nyerni a (24), (25), (44) és (45) szakirodalmi hivatkozásban leírt módszerek alkalmazásával, amelyek meghatározzák az üledék elfogyasztását vagy a részecskék kiválasztását a vizsgálati szervezetekben.

27. A természetes üledékek használat előtti laboratóriumi manipulációs eljárásait a (3), (7) és (12) irodalom írja le. A *Lumbriculus* vizsgálatban használni ajánlott mesterséges üledék elkészítését és tárolását a 4. függelék írja le.

A vizsgált vegyi anyag bevitele

28. A vizsgált vegyi anyaggal be kell szennyezni az üledéket. Mivel a legtöbb vizsgált vegyi anyagnak várhatóan alacsony a vízben való oldhatósága, a lehető legkisebb térfogatban fel kell őket oldani egy alkalmas szerves oldószerben (pl. aceton, n-hexán, ciklohexán) törzsoldat készítése érdekében. A törzsoldatot ugyanazzal az oldószerrel kell hígítani a vizsgálati oldatok elkészítéséhez. Az oldódást segítő megfelelő szer kiválasztásának fő szempontjai az oldószer toxikus hatása és illékonysága, valamint a vizsgált vegyi anyag választott oldószerben való oldhatósága. Minden egyes koncentrációszinthez a megfelelő oldat azonos térfogatát kell használni. Az üledéket ömlesztve kell szennyezni minden koncentrációszint esetében annak érdekében, hogy minimalizálni lehessen a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának ismétlések közötti variabilitását. Ezután a vizsgálati oldatokat összekeverik kvarchomokkal a 22. pontban leírtak szerint (azaz 10 g kvarchomok vizsgálati edényenként). A kvarchomok teljesen átáztatásához a 0,20–0,25 ml oldat/g homok arányt elegendőnek találták. Ezt követően az oldószert szárazságig el kell párolni. A vizsgált vegyi anyag együttes elpárolgása miatt (pl. a vegyi anyag gőznyomása függvényében) fellépő veszteségek minimalizálása érdekében a bevont homokot szárítás után azonnal fel kell használni. A száraz homokot összekeverik a megfelelő mennyiségű formulázott üledékkel a megfelelő koncentrációszinten. Az üledék elkészítése során a vizsgált vegyi anyag és a homok keverékéből származó homokot is figyelembe kell venni (azaz az üledéket kevesebb homokkal kell készíteni). Nagy előnye ennek az eljárásnak, hogy az oldószer gyakorlatilag nem kerül bele az üledékbe (7). Alternatív megoldásként, például terepről származó üledékek esetében, a vizsgált vegyi anyagot az üledék egy kiszárított és apróra őrölt részének szennyezésével is hozzá lehet adni a kvarchomok esetében fentebb leírt módon, vagy a vizsgált vegyi anyagnak a nedves üledékbe történő bekeverésével és a használt oldódást segítő szer későbbi elpárologtatásával. Biztosítani kell az üledékhez adott vizsgált vegyi anyag egyenletes eloszlását az üledékben. Szükség esetén részmintákat lehet elemezni a célkoncentrációknak az üledékben történő igazolása céljából,

▼M6

valamint a homogenitás meghatározása érdekében. A vizsgálati oldatok részmintáinak elemzése is hasznos lehet, hogy megerősítsék a célkoncentrációk elérését az üledékben. Mivel oldószert használnak a kvarchomok vizsgált vegyi anyaggal való bevonására, egy oldószer kontrollt is használni kell, amelyet ugyanakkora mennyiségű oldószerrel készítenek, mint amelyet a vizsgálati üledékek esetében használtak. Az alkalmazott szennyezési módszert, valamint a fent leírt szennyezési eljárástól eltérő módszer választásának okait jegyzőkönyvezni kell. A szennyezési módszert hozzá lehet igazítani a vizsgált anyag fizikai-kémiai tulajdonságaihoz, pl. a szennyezés vagy kiegyenlítés során fellépő párolgás miatti veszteségek elkerülése érdekében. A szennyezési eljárásokkal kapcsolatos további iránymutatást az Environment Canada (1995) nyújt (46).

29. A szennyezett üledék elkészítése, a párhuzamos vizsgálati edények közötti szétosztása, és vizsgálati vízzel való feltöltése után lehetővé kell tenni a vizsgált vegyi anyagnak az üledékből a vizes fázisba történő szétoszlását (pl. (3) (7) (9)). Ez lehetőleg a vizsgálat során alkalmazottal megegyező hőmérsékleti és levegőztetési viszonyok mellett történjen. A megfelelő ekvilibrációs idő az üledéktől és a vegyi anyagtól függ, tartama néhány órától több napig terjedhet, de ritka esetekben több (4–5) hetet is igénybe vehet. Ebben a vizsgálatban az egyensúly beállását nem várják meg, hanem 48 óra és 7 nap közötti hosszúságú kiegyenlítődési időszakot javasolnak. Így a vizsgált vegyi anyag lebomlására rendelkezésre álló idő minimalizálható. A vizsgálat céljától függően, például ha utánozni kell a környezeti feltételeket, a szennyezett üledéket hosszabb ideig is lehet ekvilibrálni vagy érlelni.

30. Az ekvilibrációs periódus végén a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának elemzéséhez mintákat kell venni legalább a fedővízből és az ömlesztett üledékből, mégpedig legalább a legmagasabb és egy alacsonyabb koncentráción. Ezek a vizsgált vegyi anyagra vonatkozó analitikai meghatározások lehetővé teszik a tömegegyensúly kiszámítását és az eredmények mért kiindulási koncentrációk alapján történő kifejezését. A mintavételezés általában megzavarja vagy elpusztítja az üledék-víz rendszert. Ezért általában nem lehet ugyanazt az ismétlést használni az üledék és a férgek mintavételezéséhez. További megfelelő méretű „analitikai”, biológiai megfigyelésekhez nem használt edényeket kell létrehozni, amelyeket azonos módon kell kezelni (beleértve a vizsgálati szervezetek jelenlétét). Az edényméreteket úgy kell megválasztani, hogy biztosítani tudják az analitikai módszer által megkívánt mennyiségű mintát. A mintavételezést részletesen az 53. pont ismerteti.

A VIZSGÁLAT ELVÉGZÉSE

Előzetes vizsgálat

31. Ha nem áll rendelkezésre információ a vizsgált vegyi anyag *Lumbriculus variegatus* fajjal szembeni toxicitásáról, hasznos lehet előzetes vizsgálatot végezni annak érdekében, hogy meghatározzák a meghatározó vizsgálatban alkalmazandó koncentrációkat, és optimalizálják a meghatározó vizsgálat vizsgálati feltételeit. E célra a vizsgált vegyi anyag koncentrációinak nagy osztásközű sorozatát használjuk. A férgek annyi ideig (pl. 28 napig, mint a meghatározó vizsgálatban) vannak kitéve a vizsgált vegyi anyag egyes koncentrációinak, amennyi lehetővé teszi a megfelelő vizsgálati koncentrációk becslését; ismétlésekre nincs szükség. Az előzetes vizsgálat során meg kell figyelni és fel kell jegyezni a férgek minden olyan viselkedését (például az üledék elkerülése), amelyet a vizsgált vegyi anyag és/vagy az üledék válthat ki. Az 1 000 mg/kg üledék száraz tömeg koncentrációt meghaladó koncentrációkat nem kell vizsgálni az előzetes vizsgálat során.

Meghatározó vizsgálat

32. A meghatározó vizsgálatban legalább öt koncentrációt kell használni, amelyeket pl. az előzetes dózisbehatároló vizsgálat (31. pont) eredménye alapján és a 35., 36., 37. és 38. pontban leírtak szerint kell kiválasztani.

▼M6

33. Egy kontrollt (az ismétlésekkel kapcsolatban lásd a 36., 37. és 38. pontot) futtatnak a vizsgálati sorozat mellett, amely az összes összetevőt tartalmazza, kivéve a vizsgált vegyi anyagot. Ha oldódást segítő szert használnak a vizsgált vegyi anyag alkalmazásához, annak nem lehet olyan jelentős hatása a vizsgálati szervezetekre, amelyet egy további oldószer kontroll ki tudna mutatni.

A vizsgálat megtervezése

34. A vizsgálat megtervezése a vizsgálat során alkalmazott koncentrációk számának és osztásközének, az egyes koncentrációkkal használt edények számának, valamint a férgek edényenkénti számának a megválasztását jelenti. Az EC_x becslésének, a NOEC becslésének, valamint a határérték-vizsgálat lebonyolításának elrendezését a 35., 36., 37. és 38. pont írja le.

35. A vizsgálat során alkalmazott koncentrációknak le kell fedniük a hatáskoncentrációt (például EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) és azt a koncentrációtartományt, amelyen belül a vizsgált vegyi anyag érdeklődésre számot tartó hatással rendelkezik. El kell kerülni a vizsgálati szervezetekre ható legkisebb koncentrációnál jóval alacsonyabb, illetve a legnagyobb vizsgált koncentráció feletti extrapolálást. Ha – kivételes esetben – ilyen extrapolálást végeznek, arra teljes körű magyarázatot kell adni a jelentésben.

36. Ha az EC_x értékét kell becsülni, legalább öt koncentrációt és minden koncentráción legalább három ismétlést kell vizsgálni; hat ismétlést javasolnak a kontroll vagy (ha van) az oldószer kontroll esetében annak érdekében, hogy javítsák a kontroll variabilitásának becslését. A jó modellbecslés lehetővé tétele érdekében minden esetben tanácsos elegendő vizsgálati koncentrációt használni. A rákövetkező koncentráció legfeljebb kétszerese legyen az előzőnek (kivételt képeznek azok az esetek, amikor a koncentráció-válasz görbe lapos). Az 5–95 % tartományban elhelyezkedő választ kiváltó vizsgálati koncentrációk számának emelkedése esetén az egyes kezeléseknél alkalmazott ismétlésszám csökkenthető. Az ismétlésszám növelése vagy a vizsgálat során alkalmazott koncentráció intervallum szűkítése általában a konfidenciaintervallum csökkenéséhez vezet.

37. Ha a LOEC/NOEC értékeket kell megbecsülni, legalább öt kísérleti koncentrációt kell használni legalább négy ismétlésben (hat ismétlés ajánlott a kontroll, illetve – ha van – az oldószer kontroll esetében annak érdekében, hogy javítsák a kontroll variabilitásának becslését) és a koncentrációk közötti szorzószám nem lehet nagyobb, mint kettő. A vizsgálati módszer körvizsgálata során végzett hipotézisvizsgálat keretében a statisztikai erővel kapcsolatban szerzett információkat a 6. függelék tartalmazza.

38. Ha nem várható hatás az 1 000 mg/kg üledék száraz tömeg koncentrációig (pl. az előzetes dózisbehatároló vizsgálat alapján), vagy ha egyetlen koncentráció vizsgálata elegendő az érdeklődésre számot tartó NOEC-érték megerősítéséhez, határérték-vizsgálatot lehet végezni (egy vizsgálati koncentráció és a kontrollok használatával). Az utóbbi esetben a vizsgálati jelentésben részletesen meg kell indokolni a határérték-koncentráció kiválasztását. A határérték-vizsgálat célja annak a koncentrációnak a meghatározása, amely elég nagy ahhoz, hogy az elvégzett vizsgálat lehetővé tegye a döntéshozók számára a vizsgált vegyi anyag lehetséges toxikus hatásainak a kizárását, és annak a határértéknek a megállapítását, amelyen túli koncentrációknak az előfordulása semmilyen esetben sem várható. Az ajánlott koncentráció 1 000 mg/kg (száraz tömeg). Általában mind a kezelés, mind a kontrollok esetében legalább hat ismétlés szükséges. A vizsgálati módszer körvizsgálata során végzett hipotézisvizsgálat keretében a statisztikai erővel kapcsolatban szerzett információkat a 6. függelék tartalmazza.

Expozíciós körülmények

A vizsgálathoz használt organizmusok

39. A vizsgálatot legalább 10 féreggel végzik a biológiai paraméterek meghatározására használt ismétlések esetében. A férgek száma körülbelül 50–100 mg nedves élőanyagnak felel meg. 17,1 % szárazanyag-tartalmat feltételezve (48) ez edényenként körülbelül 9–17 mg száraz élőanyagot eredményez. Az

▼M6

US EPA (2000) (7) az 1:50 értéket (száraz élőanyagtömeg: TOC) nem meghaladó feltöltési arányt ajánl. A 22. pontban leírt formulázott üledék esetében ez a 10 féregre körülbelül 43 g üledéknek (száraz tömeg) felel meg 2,0 % TOC-tartalommal a száraz üledékben. Azokban az esetekben, ahol edényenként több mint 10 férget használnak, az üledék és a fedővíz mennyiségét megfelelően módosítani kell.

40. Az egy vizsgálatban használt férgeknek ugyanabból a forrásból kell származniuk, és hasonló fiziológiai állapotban kell lenniük (lásd az 5. függeléket). Hasonló méretű férgeket kell kiválasztani (lásd a 39. pontot). Ajánlott az átlagtömeg becslése érdekében a vizsgálat előtt a féregtétel vagy -populáció egy részmintáját lemérni.

41. A vizsgálatban használandó férgeket eltávolítják a tenyészetből (a részleteket lásd az 5. függelékben). A közelmúltban bekövetkezett fragmentáció jelét nem mutató nagy (felnőtt) állatokat tiszta vizet tartalmazó üvegedényekbe (pl. Petri-csészékbe) helyezik át. Ezt követően az állatokat az 5. függelékében leírtak szerint szinkronizálják. Egy 10–14 napos regenerációs időszak után az enyhe mechanikai inger hatására aktív úszást vagy mászást mutató, hasonló méretű, ép, teljes férgeket kell felhasználni a vizsgálathoz. Ha a vizsgálati feltételek eltérnek a tenyésztési körülményektől (pl. a hőmérséklet, fényviszonyok és fedővíz szempontjából), egy pl. 24 órás, a vizsgálati feltételekkel megegyező hőmérsékleten, fényviszonyokkal és fedővízzel végzett akklimatizációs szakasznak elegendőnek kell lennie, hogy a férgek alkalmazkodjanak a vizsgálati körülményekhez. Az adaptálódott oligochaetákat véletlenszerűen kell elosztani a vizsgálati edények között.

Táplálás

42. Mivel a táplálékot a vizsgált vegyi anyag alkalmazása előtt (vagy alatt) adják hozzá az üledékhez, a férgek a vizsgálat alatt nem kapnak további táplálékot.

Fény és hőmérséklet

43. A kultúrában és a vizsgálatban alkalmazott megvilágítási időszak általában 16 óra (3), (7). A fényerőt az üledék felszínén fennálló természetes körülmények utánzása érdekében alacsonyan kell tartani (pl. 100–500 lux), és legalább egy alkalommal meg kell mérni az expozíciós idő alatt. A vizsgálat teljes időszaka alatt 20 ± 2 °C hőmérsékletet kell biztosítani. Egy adott mérési időpontban a vizsgálati edények hőmérsékletének különbsége nem haladhatja meg a ± 1 °C-ot. A vizsgálati edényeket randomizált módon kell elhelyezni a vizsgálati inkubátorban vagy a vizsgálati területen, pl. annak érdekében, hogy minimálisra csökkentsék a szaporodásnak az edény elhelyezkedése miatti torzítását.

Levegőztetés

44. A vizsgálati edényekben lévő fedővizet óvatosan levegőztetni kell (pl. 2–4 buborék másodpercenként) egy Pasteur-pipettán keresztül, amelyet kb. 2 cm-rel az üledékfelszín felett kell elhelyezni az üledék zavarásának minimalizálása érdekében. Ügyelni kell arra, hogy az oldott oxigén koncentrációja ne legyen kevesebb, mint a levegő telítettségi érték (ASV) 30 %-a. A levegőellátást ellenőrizni kell, és ha szükséges, munkanapokon legalább naponta egyszer be kell állítani.

A vízminőség mérése

45. Az alábbi vízminőségi paramétereket kell mérni a fedővízben:

Hőmérséklet:	hetente egyszer, valamint az expozíciós idő elején és végén legalább koncentrációszintenként egy vizsgálati edényben és egy kontroll edényben; ha lehetséges, a környező közeg (környezeti levegő vagy vízfürdő) hőmérsékletét is rögzíteni lehet, pl. óránként;

▼M6

Oldott oxigén koncentrációja:	hetente egyszer, valamint az expozíciós idő elején és végén legalább koncentrációszintenként egy vizsgálati edényben és egy kontroll edényben; mg/l és % ASV (levegő telítettségi érték) mértékegységben kifejezve;
Levegőellátás:	munkanapokon legalább naponta egyszer ellenőrizni és szükség esetén módosítani kell;
pH:	hetente egyszer, valamint az expozíciós idő elején és végén legalább koncentrációszintenként egy vizsgálati edényben és egy kontroll edényben;
Vízkeménység:	az expozíciós idő elején és végén legalább egy kontroll ismétlésben és a legmagasabb koncentráció egyik vizsgálati edényében; mg/l $CaCO_3$ mértékegységben kifejezve;
Teljes ammónia-tartalom:	az expozíciós idő elején és végén, majd azt követően hetente 3x legalább egy kontroll ismétlésben és koncentrációszintenként egy vizsgálati edényben; mg/l $NH4^+$, vagy NH3 vagy összes ammónia-N mértékegységben kifejezve.

Ha a víz minőségi paramétereinek mérése jelentős mennyiségű minta eltávolítását igényli az edényekből, tanácsos lehet elkülönített edényeket létrehozni a vízminőségi mérésekhez, hogy ne változzon meg a víz-üledék térfogatarány.

Biológiai megfigyelések

46. A vizsgálati edényeket meg kell figyelni az expozíció alatt annak érdekében, hogy vizuálisan értékeljék a férgek viselkedésében a kontrollokhoz képest mutatkozó eltéréseket (pl. üledék elkerülése, székletpellet látható az üledék felszínén). A megfigyeléseket fel kell jegyezni.

47. A vizsgálat végén minden ismétlést megvizsgálnak (a kémiai vizsgálatok számára kijelölt további edényeket ki lehet zárni ebből a vizsgálatból). Megfelelő módszert kell alkalmazni a férgek vizsgálati tartályból történő kinyerésére. Ügyelni kell arra, hogy az összes férget sértetlen állapotban lehessen kinyerni. Az egyik lehetséges eljárás a férgek szitálással történő elválasztása az üledéktől. Megfelelő lyukbőségű rozsdamentes acélhálót lehet használni. A fedővíz nagyobb részét óvatosan dekantálják, és a visszamaradó üledéket és vizet összekeverik, hogy egy zagylevet kapjanak, amelyet át lehet szűrni a szitán. 500 μm lyukbőségű szitát használva a legtöbb üledékrészecske nagyon gyorsan áthalad a szitán; a szitálást gyorsan kell elvégezni annak megakadályozására, hogy a férgek bemásszanak a szita lyukaiba vagy átmásszanak rajta. A 250 μm-es szita megakadályozza, hogy a férgek bemásznak a lyukakba vagy átmásszanak rajta; ügyelni kell azonban arra, hogy a lehető legkevesebb üledékrészecske maradjon vissza a szitában. Az ismétlések átszitált zagylevét egy második alkalommal is át lehet vezetni a szitán, hogy az összes férget kinyerjék. Alternatív módszer lehet az üledék felmelegítése, amihez a vizsgálati edényeket egy 50–60 °C-os vízfürdőbe helyezik; a férgek el fogják hagyni az üledéket és egy tűzcsiszolt széles szájú pipetta segítségével össze lehet őket gyűjteni az üledék felszínéről. Egy másik alternatív módszer lehet, ha az üledékből zagylevet készítenek, és egy megfelelő méretű sekély serpenyőbe öntik. A sekély zagyrétegből a férgeket acéltűvel vagy óráscsipesszel (inkább villaként, mint csipeszként használva, hogy a férgek ne sérüljenek meg) fel lehet szedegetni és át lehet helyezni tiszta vízbe. A férgeket az üledék-zagylétől történő elválasztás után vizsgálati közeggel leöblítik és megszámolják.

48. Az alkalmazott módszertől függetlenül a laboratóriumnak be kell bizonyítania, hogy a személyzet képes a szervezetek átlagosan legalább 90 %-át kinyerni a teljes üledékből. Például bizonyos számú vizsgálati organizmust

▼M6

lehet hozzáadni a kontroll üledékhez vagy a vizsgálati üledékekhez, és 1 óra elteltével meghatározni a kinyerési arányt (7).

49. Az ismétlésenkénti élő és elhullott egyedek számát fel kell jegyezni és értékelni kell. A férgek alábbi csoportjait kell elhullottnak tekinteni:

a) nincs reakció enyhe mechanikai ingerre

b) lebomlás jelei figyelhetők meg (az „a” ponttal együtt)

c) eltűnt férgek

Továbbá, az élő férgeket három csoport egyikébe lehet rendelni:

a) nagy teljes férgek (felnőttek) regenerálódott testtájak nélkül

b) teljes férgek regenerálódott, világosabb színű testtájakkal (azaz új posterior résszel, új anterior résszel, vagy egyaránt új anterior és posterior résszel)

c) hiányos férgek (azaz a közelmúltban fragmentálódott férgek nem regenerálódott testtájakkal)

Ezek a kiegészítő megfigyelések nem kötelezőek, de felhasználhatók a biológiai eredmények további értelmezésére (például nagy számú féreg besorolása a c csoportba a szaporodás és a regeneráció késését jelezheti egy adott kezelési csoportban). Továbbá, ha különbségek figyelhetők meg a kezelt és a kontroll férgek külső megjelenésében (pl. a kültakaró elváltozásai, ödémás testszakaszok), ezeket fel kell jegyezni.

50. Közvetlenül a számolás/értékelés után az egyes ismétlésekben található élő férgeket áthelyezik szárított, előzetesen lemért és felcímkézett mérőtálkákba (replikátumonként egy tálka), és mérőtálkánként egy csepp etanollal elpusztítják őket. A mérőtálkákat szárítókemencébe helyezik 100 ± 5 °C-on egy éjszakán át száradni, majd a szárítóban történt lehűtést követően megmérik őket, és meghatározzák a férgek száraz tömegét (lehetőleg g-ban, legalább 4 tizedesjegyig).

51. A teljes száraz tömeg mellett a hamumentes száraz tömeget is meg lehet határozni a (49) szakirodalmi hivatkozásban leírtak szerint annak érdekében, hogy figyelembe lehessen venni a férgek emésztőrendszerében jelen lévő, az elfogyasztott üledékből származó szervetlen komponenseket.

52. Az élőanyagot az ismétlésenkénti teljes biomasszában határozzák meg, beleértve a felnőtt és a fiatal férgeket is. Az elhullott férgeket nem kell figyelembe venni az ismétlések élőanyagtömegének meghatározása során.

A vizsgált vegyi anyag koncentrációinak ellenőrzése

Mintavétel

53. A vizsgált vegyi anyag kémiai analíziséhez való mintákat legalább a legmagasabb koncentrációból és egy alacsonyabb koncentrációból kell venni, legalább a kiegyenlítődési szakasz végén (a vizsgálati szervezetek hozzáadása előtt) és a vizsgálat végén. Legalább az ömlesztett üledékből és a fedővízből kell mintát venni az elemzéshez. Legalább két mintát kell venni mátrixonként és kezelésenként minden mintavételi időpontban. Az egyik mintát tartalékként félre lehet tenni (pl. arra az esetre, ha a kezdeti elemzés kívül esik a névleges koncentráció ± 20 %-os tartományán). Speciális kémiai tulajdonságok esetében, például ha a vizsgált vegyi anyag gyors

▼M6

lebomlása várható, az analitikai menetrendet a szakértői vélemények alapján finomítani lehet (pl. gyakoribb mintavételezés, több koncentrációszint elemzése). Mintákat lehet venni a közbenső mintavételi időpontokon is (pl. az expozíció kezdete utáni hetedik napon).

54. A fedővízből óvatos dekantálás vagy a fedővíz leszívása útján kell mintát venni, hogy minimalizálható legyen az üledék felzavarása. A minták térfogatát fel kell jegyezni.

55. A fedővíz eltávolítása után az üledéket homogenizálni kell és át kell tölteni egy megfelelő tartályba. A nedves üledékminta tömege feljegyzésre kerül.

56. Amennyiben ezen kívül a pórusvízben lévő vizsgált vegyi anyag elemzése is szükséges, a homogenizált és lemért üledékmintákat centrifugálni kell a pórusvíz kinyeréséhez. Például körülbelül 200 ml nedves üledéket lehet betölteni egy 250 ml-es centrifugapohárba. Ezt követően a mintákat szűrés nélkül kell centrifugálni a pórusvíz izolálásához, pl. 10 000 ± 600 × g értéken, 30-60 percen át, a vizsgálat során alkalmazott hőmérsékletet nem meghaladó hőmérsékleten. Centrifugálás után a felülúszót dekantálják vagy pipettával leszívják, ügyelve arra, hogy semmilyen üledékrészecske ne kerüljön bele, és a térfogatot feljegyzik. Feljegyzik a megmaradó üledékpellet tömegét. Megkönnyítheti a tömegegyensúly becslését vagy a vizsgált vegyi anyag kinyerését a víz-üledék rendszerből, ha minden mintavételi időpontban meghatározzák az üledék száraz tömegét. Ha a minta mérete túl kicsi, akkor előfordulhat, hogy nem analizálható a koncentráció a pórusvízben.

57. Az azonnali analízis meghiúsulása esetén a mintákat megfelelő módszerrel kell tárolni, pl. az adott vizsgált vegyi anyag minimális lebomlása érdekében ajánlott tárolási körülmények mellett (pl. a környezeti mintákat általában – 18 °C-on, sötétben tárolják). A vizsgálat megkezdése előtt szerezzen információt az adott vizsgált vegyi anyag megfelelő tárolási körülményeiről, például a tárolás időtartamáról és hőmérsékletéről, a kivonási eljárásokról, stb.

Analitikai módszer

58. Mivel az egész eljárást alapvetően a vizsgált anyaghoz használt analitikai módszer pontossága és érzékenysége határozza meg, kísérlettel kell ellenőrizni legalább a legalacsonyabb és a legmagasabb koncentráción, hogy a kémiai analízis pontossága és reprodukálhatósága, valamint a vizsgált anyag vízből és üledékmintákból való visszanyerése kielégítő-e az adott módszer szempontjából. Ellenőrizni kell azt is, hogy a vizsgált anyag kimutatható-e a kontroll kamrákban a kimutatási határértéket meghaladó koncentrációban. Ha szükséges, javítsa ki a névleges koncentrációkat a minőségellenőrző szennyezések visszanyerési értékeire (pl. ha a visszanyerés a szennyező mennyiség 80–120 %-os tartományán kívül esik). A vizsgálat során a mintákat mindvégig úgy kell kezelni, hogy a szennyeződés és a veszteség (például a vizsgált vegyi anyag mintavevő eszközön való adszorbeálódása következtében) a lehető legkisebb mértékű legyen.

59. A vizsgált vegyi anyag visszanyerését, a mennyiségi meghatározási határértéket, és a kimutatási határértéket üledékben és vízben fel kell jegyezni és bele kell foglalni a jelentésbe.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

60. A vizsgálat statisztikailag értékelendő főbb kötelező hatásváltozói az élőanyagtömeg és a férgek száma ismétlésenként. Opcionálisan a szaporodás (például a féregszám növekedése) és a növekedés (például a száraz élőanyagtömeg növekedése) is értékelhető. Ebben az esetben el kell végezni a férgek száraz tömegének becslését az expozíció kezdetén, pl. megmérve a vizsgálatban használandó szinkronizált féregtétel egy reprezentatív részmintájának száraz tömegét.

▼M6

61. Bár a mortalitás nem végpontja a vizsgálatnak, a mortalitást ki kell értékelni, amennyire csak lehetséges. A mortalitás becsléséhez azokat a férgeket, amelyek nem reagálnak enyhe mechanikai ingerre vagy a bomlás jeleit mutatják, valamint a hiányzó férgeket elpusztultnak kell tekinteni. Az elhullásokat legalább fel kell jegyezni és figyelembe kell venni a vizsgálati eredmények értelmezése során.

62. A hatáskoncentrációkat mg/kg üledék száraz tömeg mértékegységben kell megadni. Ha a vizsgált vegyi anyagnak az üledékben, vagy az üledékben és fedővízben az expozíció elején mért visszanyerése a névleges koncentráció 80–120 %-a, a hatáskoncentrációkat (EC_x, NOEC, LOEC) a névleges koncentráció alapján is ki lehet fejezni. Ha visszanyerés a névleges koncentráció több mint ± 20 %-ával eltér a névleges koncentrációtól, a hatáskoncentrációkat (EC_x, NOEC, LOEC) az expozíció elején mért kezdeti koncentrációkra kell alapozni, pl. figyelembe véve a vizsgált vegyi anyag tömegegyensúlyát a vizsgálati rendszerben (lásd a 30. pontot). Ezekben az esetekben további információt lehet szerezni a törzs- és/vagy alkalmazási oldatok elemzése alapján annak megerősítése érdekében, hogy a vizsgált üledékeket megfelelően készítették el.

EC_x

63. A 60. pontban leírt paraméterekhez tartozó EC_x-értékeket megfelelő statisztikai módszerekkel számítják ki (pl. probit analízis, logisztikai vagy Weibull-függvény, vágott Spearman-Karber módszer vagy egyszerű interpoláció). A statisztikai értékeléshez iránymutatás a (15) és (50) szakirodalmi hivatkozásban található. Az EC_x-értéket úgy kapják meg, hogy a kapott egyenletbe beillesztenek egy értéket, amely megfelel a kontroll átlaga x %-ának. Az EC_{50} vagy bármely más EC_x kiszámításához a kezelésenkénti átlagokat ($\overline{X}$) regressziós elemzésnek kell alávetni.

NOEC/LOEC

64. Ha a statisztikai elemzés célja a NOEC/LOEC meghatározása, edényenkénti statisztikákra (az egyes edények ismétlésnek minősülnek) van szükség. Megfelelő statisztikai módszereket kell alkalmazni. Általában a vizsgált vegyi anyag kontrollal összehasonlítva mutatott káros hatásait egyoldali (kisebb) hipotézisvizsgálattal vizsgálják ki ($p \leq 0{,}05$). A példákat lásd a következő pontokban. A megfelelő statisztikai módszerek kiválasztására vonatkozó iránymutatást a (15) és (50) irodalom tartalmazza.

65. Az adatok normál eloszlását például a Kolmogorov–Szmirnov-féle illeszkedéspróbával, a tartomány-szórás arány próbával (R/S-próba), vagy a Shapiro–Wilk-féle próbával (kétoldalas, $p \leq 0{,}05$) lehet vizsgálni. A Cochran-próbát, a Levene-próbát vagy a Bartlett-próbát (kétoldalas, $p \leq 0{,}05$) lehet használni a szóráshomogenitás vizsgálatára. Ha a paraméteres vizsgálati eljárások előfeltételei (normalitás, szórás homogenitás) teljesülnek, egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA), majd ezt követően többszörös összehasonlító próbákat lehet végezni. Páronkénti összehasonlító vizsgálatokat (pl. Dunnett-féle t-próba), vagy lépésenkénti trendvizsgálatokat (pl. Williams-próba) lehet használni annak kiszámítására, hogy vannak-e szignifikáns különbségek ($p \leq 0{,}05$) a kontrollok és a különféle vizsgálati elemek koncentrációi között. Ellenkező esetben nemparaméteres módszereket (pl. a Holm szerint módosított Bonferroni-féle U-próbát vagy a Jonckheere–-Terpstra-féle trendpróbát) kell használni a NOEC és a LOEC meghatározására.

Határérték-vizsgálat

66. Ha határérték-vizsgálatot (a kontroll és egyetlen kezelés összehasonlítása) végeztek, és a parametrikus vizsgálati eljárások előfeltételei (normalitás, homogenitás) teljesülnek, a metrikus válaszokat (az összes féreg száma és a férgek száraz tömegében kifejezett élőanyag) a Student-féle próbával (t-próba) lehet értékelni. Ha a feltételek nem teljesülnek, akkor a nem egyenlő szórásnégyzeteket feltételező t-próba (Welch-féle t-próba) vagy egy nemparaméteres próba, például a Mann-Whitney-féle U-próba alkalmazható. A vizsgálati módszer körvizsgálata során végzett hipotézisvizsgálat keretében a statisztikai erővel kapcsolatban szerzett információkat a 6. függelék tartalmazza.

▼M6

67. A kontrollok (kontroll és oldószer kontroll) közötti szignifikáns különbségek meghatározása céljából az egyes kontrollok ismétléseit a határérték-vizsgálatnál leírtak szerint kell vizsgálni. Ha ezek a tesztek nem mutatnak ki szignifikáns eltérést, a kontroll és az oldószer kontroll ismétléseit össze lehet vonni. Ellenkező esetben az összes kezelést az oldószer kontrollal kell összehasonlítani.

Az eredmények értelmezése

68. Amennyiben eltértek a vizsgálati módszertől és a vizsgált oldatok mért koncentrációi az analitikai módszer kimutatási határához közeli szinten vannak, az eredményeket óvatosan kell értelmezni. A vizsgálati módszertől való bármilyen eltérést fel kell jegyezni.

Vizsgálati jegyzőkönyv

69. A vizsgálati jegyzőkönyvnek legalább a következő információkat kell tartalmaznia:

— *Vizsgált vegyi anyag:*

— kémiai azonosító adatok (közönséges név, kémiai név, szerkezeti képlet, CAS-szám, stb.), beleértve a kémiai tisztaságot és a vizsgált vegyi anyag mennyiségi meghatározásának analitikai módszerét; a vizsgált vegyi anyag beszerzési forrása, az alkalmazott oldószerek azonosítása és koncentrációja,

— a vizsgálat megkezdése előtt beszerzett, a vizsgált vegyi anyag fizikai természetére és fizikai-kémiai tulajdonságaira vonatkozó rendelkezésére álló információk (pl. vízben való oldhatóság, gőznyomás, megoszlási hányados a talajban (vagy az üledékben, ha van ilyen), log K_{ow}, stabilitás vízben, stb.);

— *A vizsgálathoz felhasznált faj:*

— tudományos név, származás, esetleges előkezelés, akklimatizáció, tenyésztési körülmények, stb.

— *Vizsgálati körülmények:*

— alkalmazott vizsgálati eljárás (pl. statikus, félstatikus vagy állandó áramlású);

— a vizsgálat kialakítása (pl. vizsgálati kamrák száma, anyaga és mérete, vízmennyiség edényenként, üledék tömege és térfogata edényenként (állandó áramlású vagy félstatikus eljárások: vízmennyiség helyettesítési ráta), vizsgálat előtti és alatti levegőztetés, ismétlések száma, férgek száma ismétlésenként az expozíció elején, kísérleti koncentrációk száma, kondicionálás hossza, kiegyenlítődési és expozíciós időtartam, mintavétel gyakorisága);

— az üledék és a fedővíz mélysége,

— a vizsgált vegyi anyag előkezelésének, illetve addíciójának/alkalmazásának módszere;

— a névleges kísérleti koncentrációk, a kémiai vizsgálathoz történő mintavétel részletei, és az analitikai módszerek, amelyekkel a vizsgált vegyi anyag koncentrációit megmérték;

— az üledék jellemzői a 24–25. pontban leírtak szerint, bármely egyéb elvégzett mérés; a formulázott üledék elkészítése;

— a vizsgálathoz használt víz előállítása (mesterséges víz használata esetén) és jellemzői (oxigénkoncentráció, pH, vezetőképesség, keménység, és bármely egyéb elvégzett mérés) a vizsgálat megkezdése előtt;

— a táplálásra vonatkozó információk, beleértve a táplálék típusát, elkészítését, mennyiségét és a táplálás rendjét;

▼**M6**

— a fényerő és a megvilágítási időszak(ok);

— a biológiai paraméterek (pl. mintavétel, ellenőrzés, vizsgálati organizmusok tömegének mérése) és az összes abiotikus paraméter (pl. a víz és az üledék minőségi paraméterei) meghatározására alkalmazott módszerek;

— a kémiai elemzésre vett minták térfogata és/vagy tömege;

— a kémiai elemzésre vett minták kezelésének részletes bemutatása, beleértve az előkészítés részleteit, a tárolást, a szennyezési eljárásokat, az extrakciót és az analitikai eljárásokat (és pontosságukat) a vizsgált vegyi anyagra vonatkozóan, és a vizsgált tétel visszanyerését.

— *Eredmények:*

— vízminőség a vizsgálati edényekben (pH, hőmérséklet, oldott oxigén koncentráció, keménység, ammónia-koncentráció, és bármely egyéb elvégzett mérés);

— összes szerves szén tartalom (TOC), a száraz és nedves tömeg aránya, az üledék pH-ja, és bármely egyéb elvégzett mérés;

— férgek száma, és ha meghatározták, a teljes és nem teljes férgek száma az egyes vizsgálati kamrákban a vizsgálat végén;

— a férgek száraz tömege az egyes vizsgálati kamrákban a vizsgálat végén, és amennyiben megmérték, a férgek egy részmintájának száraz tömege a vizsgálat kezdetén;

— bármely megfigyelt rendellenes viselkedés, összehasonlítva a kontrollokal (pl. üledék elkerülése, székletpelletek jelenléte vagy hiánya);

— észlelt elhullás;

— toxicitási végpontok (például ECx, NOEC és/vagy LOEC) becsült értékei, valamint a meghatározásukhoz használt statisztikai módszerek;

— a névleges vizsgálati koncentrációk, a mért vizsgálati koncentrációk és a kísérleti edények vizsgált vegyi anyag koncentrációjának meghatározására használt analízisek eredményei,

— az érvényességi kritériumoktól való bármely eltérés.

— *Az eredmények értékelése:*

— az eredmények megfelelése a 13. bekezdésben felsorolt érvényességi kritériumoknak,

— az eredmények szöveges elemzése, beleértve az e vizsgálati módszertől való eltérések vizsgálat kimenetelére gyakorolt hatását.

SZAKIRODALOM

(1) EC (2003). Technikai iránymutató dokumentum a Bizottság 93/67/EGK irányelve az új bejelentett anyagok kockázatértékeléséről, a Bizottság 1488/94/EK rendelete a létező anyagok kockázatértékeléséről és az Európai Parlament és a Tanács 98/8/EK irányelve a biocid termékek forgalomba hozataláról alátámasztására; I–IV. rész. Az EK Hivatalos Kiadó Hivatala (Európai Bizottság), Luxembourg.

(2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (OECD), Párizs.

▼**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) E melléklet „Árvaszúnyogok életciklusára ható toxicitás vizsgálata üledékvíz rendszerben, szennyezett üledék használatával” című C.27. fejezete.

(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. 1997. december.

(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. 1.

(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 (Amerikai Anyagvizsgáló Társaság), 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 (Amerikai Anyagvizsgáló Társaság).

▼**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. Toxicol. 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) E melléklet C.1. fejezete: Akut toxicitás hal esetében.

(38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Toxikológiai vizsgálat halak egyedfejlődésének kezdeti szakaszán (FELS) OECD, Párizs.

(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.-27.04.1999, 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.

A statisztikai eljárásokkal kapcsolatos további irodalom:

Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York.

Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591-611.

Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519 531.

▼M6

1. függelék

Fogalommeghatározások

E vizsgálati módszer alkalmazásában a következő fogalommeghatározások alkalmazandók:

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

A **kondicionálási időszakot** arra használják, hogy stabilizálják az üledék mikrobiális komponensét és eltávolítsák pl. az üledékkomponensekből származó ammóniát; az üledék vizsgált vegyi anyaggal történő szennyezése előtt zajlik. A fedővizet a kondicionálás után általában elöntik.

Az $\mathbf{EC_x}$ a vizsgált anyag azon koncentrációja az üledékben, amely X % (például 50 %) hatást gyakorol egy biológiai paraméterre a meghatározott expozíciós időszak alatt.

A **kiegyenlítődési szakaszt** arra használják, hogy lehetővé tegyék a vizsgált vegyi anyag eloszlását a szilárd fázis, a pórusvíz és a fedővíz között; az üledék vizsgált vegyi anyaggal történő szennyezése után és a vizsgálati organizmusok hozzáadása előtt kerül rá sor.

Expozíciós fázis: azt az időtartamot jelöli, amely alatt a vizsgálathoz használt organizmusok ki vannak téve a vizsgált vegyi anyag hatásának.

Formulázott üledék vagy kevert, mesterséges vagy szintetikus üledék: a természetes üledék fizikai összetevőinek az imitálására használt anyagok keveréke.

Észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció (LOEC): a vizsgált vegyi anyag azon legalacsonyabb vizsgálati koncentrációja, amelynél a kontrollal összevetve még megfigyelhető a vegyi anyag egy jelentős toxikus hatása ($p \leq 0,05$). Az LOEC felett ugyanakkor minden koncentrációnak legalább akkora hatást kell eredményeznie, mint amelyet az LOEC okoz. Ha ez a két feltétel nem elégíthető ki, az LOEC (és így az NOEC) megválasztását részletesen indokolni kell.

Észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC): a közvetlenül a LOEC alatti vizsgálati koncentráció, amely – a kontrollcsoporttal való összevetésben – nem fejt ki statisztikailag jelentős hatást ($p \leq 0,05$), a meghatározott expozíciós időszak alatt.

Oktanol-víz megoszlási hányados (K_{ow}; néha P_{ow}): a vegyi anyag n-oktanolban és vízben való oldhatóságának aránya egyensúlyi állapotban; a vegyi anyag lipofilitását fejezi ki (e melléklet A.24. fejezete). A K_{ow}-t vagy logaritmusát ($\log K_{ow}$) a vegyi anyag vízi szervezetekben való felhalmozódási képességének kifejezésére használják.

Szerves szén-víz megoszlási hányados (K_{oc}): a vegyi anyag üledék szerves szén frakciójában/frakcióján és vízben mért koncentrációjának hányadosa egyensúlyi állapotban.

Fedővíz: a vizsgálati edényben az üledéket befedő víz.

Pórusvíz vagy szemcseközi víz: az üledék és a talaj szemcséi közötti helyet kitöltő víz.

Szennyezett üledék: a vizsgált vegyi anyaggal szennyezett üledék.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼**M6**

2. függelék

Az ajánlott mesterséges víz összetétele

(e melléklet C.1. fejezetéből átvéve (1))

a) *Kalcium-klorid oldat*

Oldjon fel 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$-t ionmentesített vízben; töltse fel 1 l-re ionmentesített vízzel

b) *Magnézium-klorid oldat*

Oldjon fel 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$-t ionmentesített vízben; töltse fel 1 l-re ionmentesített vízzel

c) *Nátrium-karbonát oldat*

Oldjon fel 2,59 g $NaHCO_3$-ot ionmentesített vízben; töltse fel 1 l-re ionmentesített vízzel

d) *Kálium-klorid oldat*

Oldjon fel 0,23 g KCl-ot ionmentesített vízben; töltse fel 1 l-re ionmentesített vízzel

Minden kémiai anyagnak analitikai tisztaságúnak kell lennie.

A desztillált vagy ionmentesített víz vezetőképessége nem haladhatja meg a 10 μScm^{-1} értéket.

Az a) és d) oldatból 25-25 ml-t összekevernek, és a térfogatot feltöltik 1 literre ionmentesített vízzel. A kalcium- és magnézium-ionok összege ezekben az oldatokban 2,5 mmol/l.

A Ca:Mg ionok aránya 4: 1, Na:K ionok aránya 10: 1. Ennek az oldatnak a $K_{S4.3}$ savkapacitása 0,8 mmol/l.

A hígítóvizet az oxigén telítettség eléréséig szellőztesse, majd felhasználás előtt körülbelül két napig, további levegőztetés nélkül tárolja.

HIVATKOZÁS

(1) E melléklet C.1. fejezete: Akut toxicitás hal esetében.

▼**M6**

3. függelék

Az elfogadható minőségű hígítóvíz fizikai-kémiai tulajdonságai

Összetevő	Koncentráció
Szemcsés anyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 μg/l
Ionizálatlan ammónia	< 1 μg/l
Maradék klór	< 10 μg/l
Szerves foszfort tartalmazó növényvédő szerek	< 50 ng/l
Összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer plusz poliklórozott bifenilek	<50 ng/l
Összes szerves klór	< 25 ng/l
(az OECD (1992) (1) kiadványból átvéve)	

Hivatkozás

(1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Toxikológiai vizsgálat halak egyedfejlődésének kezdeti szakaszán (FELS) OECD, Párizs.

▼M6

4. függelék

Ajánlott mesterséges üledék – iránymutatás az előállításhoz és tároláshoz

Üledékösszetevők

Összetevő	Jellemzők	üledék száraz tömeg %-a
Tőzeg	Tőzegmoha tőzeg, lebomlás foka: „közepes”, levegőszáraz, látható növényi maradványok nincsenek, finomra őrölt (szemcseméret ≤ 0,5 mm)	5 ± 0.5
Kvarchomok	Szemcseméret: ≤ 2 mm, de a részecskék több mint 50 százaléka a 50–200 μm tartományban legyen	= 75 – 76
Kaolinit agyag	Kaolinittartalom ≥ 30 %	20 ± 1
Táplálékforrás	pl. Urtica-por (Folia urticae), Urtica dioica levelek (nagy csalán), finomra őrölt (szemcseméret ≤ 0,5 mm); a gyógyszertári szabványoknak megfelelően, emberi fogyasztásra; a száraz üledéken felül	0.4–0.5 %
Szerves szén	Tőzeg és homok hozzáadásával beállítva	2 ± 0,5
Kalcium-karbonát	$CaCO_3$, porított, kémiailag tiszta, a száraz üledéken felül	0,05 – 1
Ionmentesített víz	Vezetőképesség ≤ 10 μS/cm, a száraz üledéken felül	30 – 50

Megjegyzés: Ha megemelkedett ammónia-koncentrációk várhatók (pl. ha a vizsgált vegyi anyagról ismert, hogy gátolja a nitrifikációt), hasznos lehet a nitrogéngazdag Urtica-por 50 %-át cellulózzal helyettesíteni (pl. α-cellulóz por, kémiailag tiszta, ≤ 0,5 mm-es szemcseméret, (1) (2)).

Előkészítés

A levegőn szárított tőzeget finom porrá őrlik. Nagyteljesítményű homogenizáló készülék segítségével ionmentesített vízzel szuszpenziót készítünk a szükséges mennyiségű tőzegporból. A szuszpenzió pH-ját $CaCO_3$ hozzáadásával 5,5 ± 0,5 értékre kell beállítani. A pH és a mikrobiológiai összetétel stabilizálása végett 20 ± 2 °C hőmérsékleten lassú keveréssel legalább két napig kondicionálják a szuszpenziót. Az ezt követően ismét megmért pH-nak 6,0 ± 0,5 értéket kell mutatnia. Ezek után a tőzegszuszpenziót összekeverik a többi összetevővel (homok és kaolinagyag) és ionmentesített vízzel úgy, hogy az üledék száraz tömegének 30–50 százaléka közötti víztartalommal rendelkező, homogén üledéket kapjanak. A végtermékként kapott keverék pH-ját ismételten megmérik, és szükség esetén $CaCO_3$ hozzáadásával 6,5–7,5 értékre állítják be. Ha azonban ammónia képződése várható, akkor hasznos lehet az üledék pH-ját 7,0 alatt tartani (pl. 6,0–6,5 között). Az üledékből vett minta alapján meghatározzák a száraz tömeget és a szerves széntartalmat. Ha ammónia képződése várható, a formulázott üledéket hét napig kondicionálni lehet ugyanolyan körülmények között, amelyek az ezt követő vizsgálat tekintetében érvényesek (pl. 1: 4 üledék-víz arány, az üledékréteg magassága megegyezik a vizsgálati edényekben lévő magassággal) a vizsgált vegyi anyaggal történő szennyezés előtt, azaz fel

▼M6

kell önteni vízzel, amelyet levegőztetni kell. A kondicionálási időszak végén a fedővizet el kell távolítani és ki kell önteni. Ezt követően a szennyezett kvarchomokot minden kezelési szint esetében összekeverik az üledékkel, az üledéket szétosztják a párhuzamos kezelt edények között, és felöntik a vizsgálati vízzel. Az edényeket ezután ugyanolyan feltételek mellett inkubálják, mint amelyek a rákövetkező vizsgálat során érvényesülnek. Itt kezdődik a kiegyenlítődési időszak. A fedővizet levegőztetni kell.

A kiválasztott táplálékforrást az üledék vizsgált vegyi anyaggal történő szennyezése előtt vagy alatt kell hozzáadni. Az elején össze lehet keverni a tőzegszuszpenzióval (lásd fent). A táplálékforrás túlzott lebomlása a vizsgálati organizmusok hozzáadása előtt (pl. hosszú kiegyenlítődési időszak esetén) elkerülhető azáltal, ha a táplálék hozzáadása és az expozíció kezdete közötti időszak a lehető legrövidebb. Annak érdekében, hogy a táplálékot a vizsgált vegyi anyag biztosan beszennyezze, a táplálékforrást az üledékkel azon a napon kell összekeverni, amikor az üledéket a vizsgált vegyi anyaggal beszennyezik.

Tárolás

A mesterséges üledék előállításához használt száraz összetevők száraz, hűvös helyen, szobahőmérsékleten tárolhatók. Az elkészített, vizsgált vegyi anyaggal szennyezett üledéket azonnal fel kell használni a vizsgálatban. A szennyezett üledékmintákat az adott vizsgált vegyi anyag esetében ajánlott körülmények között lehet tárolni az analízis elvégzéséig.

HIVATKOZÁSOK

(1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

▼M6

5. függelék

A lumbriculus variegatus tenyésztési módszerei

A *Lumbriculidae* család, *Oligochaeta* alosztályába tartozó *Lumbriculus variegatus* (Müller) édesvízi üledéklakó faj és széles körben használják ökotoxikológiai vizsgálatokban. Laboratóriumi körülmények között könnyen tenyészthető. A tenyésztési módszereket a következőkben vázoljuk.

Tenyésztési módszerek

A *Lumbriculus variegatus* tenyésztésének feltételeit részletes ismertetik Phipps és munkatársai (1993) (1), Brunson és munkatársai (1998) (2), az ASTM (2000) (3) és a US EPA (2000) (4). Az alábbiakban e feltételek rövid összefoglalása található. Az *L. variegatus* legnagyobb előnye a gyors szaporodás, ami gyorsan növekvő élőanyagtömeget eredményez a laboratóriumban tenyésztett populációkban (pl. (1), (3), (4), (5)).

A férgeket nagy akváriumokban (57–80 l), 23 °C-on, 16 óra fényes és 8 óra sötét megvilágítási időszak mellett (100–1 000 lx) lehet tenyészteni, naponta cserélt természetes víz felhasználásával (45–50 l akváriumonként). A szubsztrátumot úgy állítjuk elő, hogy fehérítetlen barna papírtörlőt csíkokra vágunk, amelyeket azután tenyésztővízzel néhány másodpercig összekeverünk. Ez kis papírdarabokból álló szubsztrátumot eredményez. Ez a szubsztrátum azután közvetlenül felhasználható a *Lumbriculus* tenyésztőakváriumokban a tartály aljának befedésére, vagy ionmentesített vízben lefagyasztva későbbi felhasználásig tárolható. A tartályban újonnan elhelyezett szubsztrátum általában körülbelül két hónapig tart.

Minden féregtenyészetet 500–1 000 féreggel indítunk, amelyeket heti 3 alkalommal 6 g indító pisztrángeledelt tartalmazó 10 ml szuszpenzióval etetünk, vízcserés vagy állandó áramlású rendszerben. A statikus vagy félstatikus rendszerben nevelt tenyészeteket ritkábban etetjük a baktériumok és gombák szaporodásának megelőzésére..

Ilyen körülmények között a tenyészetben található az egyedek száma általában körülbelül 10–14 naponta megduplázódik.

A *Lumbriculus variegatus* ehelyett tenyészthető a mesterséges üledékhez használttal megegyező (1–2 cm-es mélységű) kvarchomok rétegből és mesterséges vízből álló rendszerben is. Tenyésztőedényként 12–20 cm-es magasságú üveg- vagy rozsdamentes acél tartályok használhatók. A fedővizet enyhén levegőztetni kell (pl. két buborék másodpercenként) egy kb. 2 cm-rel az üledékfelszín felett elhelyezett Pasteur-pipettán keresztül. Hogy elkerüljük pl. az ammónia felhalmozódását, a fedővizet állandó áramlású rendszer használatával vagy legalább hetente egyszer manuálisan kell cserélni. A kevéssertéjűeket szobahőmérsékleten lehet tartani 16 óra fényes (100–1 000 lx fényerő) és 8 óra sötét megvilágítási időszakkal. A félstatikus tenyészetekben (vízcsere hetente egyszer) a férgeket hetente kétszer TetraMinnal etetjük (pl. 0,6–0,8 mg/cm^2 üledékfelület), amelyet milliterenként 50 mg TetraMint tartalmazó ionmentesített vízbes szuszpenzióban lehet adagolni.

A *Lumbriculus variegatus* egyedeket úgy lehet eltávolítani a tenyészetekből, hogy pl. egy finom hálóval a szubsztrátumot vagy pedig egy tűzcsiszolt, széles szájú (kb. 5 mm átmérőjű) üvegpipettával az organizmusokat helyezzük át egy külön főzőpohárba. Ha szubsztrátumot is áthelyezünk a főzőpohárba, a férgeket és a szubsztrátumot tartalmazó főzőpoharat egy éjszakán át állandó áramlású rendszerfeltételek között tartjuk, amellyel a szubsztrátum eltűnik a főzőpohárból, míg a férgek az edény alján maradnak. Ezeket azután áttehetjük újonnan előkészített tenyésztőtartályokba, vagy a (3) és (4) szakirodalmi hivatkozásban, illetve a következőkben vázoltak szerint tovább vizsgálhatjuk őket.

Kritikus kérdés a *L. variegatus* üledékvizsgálatokban történő használata során a faj szaporodási módja (architomia vagy morfallaxis, pl. (6)). Ez a fajta ivartalan szaporodás két fragmentet eredményez, amelyek a fej- és a farokrész regenerálódásáig nem táplálkoznak (pl. (7), (8)). Ez azt jelenti, hogy a *L. variegatus* fajban a szennyezett üledék elfogyasztása útján történő expozíció nem folyamatos.

▼M6

Ezért szinkronizálást kell végezni az ellenőrizetlen reprodukció és regeneráció, illetve a vizsgálati eredmények ebből következő nagyfokú változékonyságának minimalizálása érdekében. Ilyen mértékű változékonyság akkor fordulhat elő, ha egyes egyedek, amelyek fragmentálódtak, egy bizonyos ideig nem táplálkoznak, és ezért kevésbé vannak kitéve a vizsgált vegyi anyagnak, mint más egyedek, amelyek nem fragmentálódnak a vizsgálat alatt (9), (10), (11). 10 és 14 nappal az expozíció megkezdése előtt a férgeket mesterségesen fragmentálni kell (szinkronizálás). A szinkronizáláshoz lehetőleg olyan nagy (felnőtt) férgeket kell kiválasztani, amelyek nem mutatják közelmúltbeli morfallaxis jeleit. Ezeket a férgeket egy csepp tenyésztővízben tárgylemezre helyezzük, és egy szikével kettévágjuk a test középső régiójában. Ügyelni kell arra, hogy a posterior végek hasonló méretűek legyenek. A posterior végeket ezután az expozíció kezdetéig hagyni kell új fejet növeszteni egy tenyésztőedényben, amely ugyanazt a szubsztrátumot tartalmazza, mint amelyet a tenyészetben használtunk, valamint mesterséges vizet. Az új fej regenerációját az jelzi, ha a szinkronizált férgek beássák magukat a szubsztrátumba (a regenerált fej megjelenése egy reprezentatív részminta binokuláris mikroszkóp alatt végzett ellenőrzésével is megerősíthető). A vizsgálati szervezetek ezután várhatóan hasonló fiziológiai állapotban lesznek. Ez azt jelenti, hogy ha morfallaxis útján történő szaporodás következik be a szinkronizált férgekben a vizsgálat alatt, akkor gyakorlatilag az összes állat várhatóan ugyanolyan mértékben lesz kitéve a szennyezett üledéknek. A szinkronizált férgeket egyszer kell megetetni, amikor a férgek elkezdik beásni magukat a szubsztrátumba, vagy 7 nappal a kettémetszés után. Az etetési rendnek összehasonlíthatónak kell lennie a rendes tenyészetekével, és tanácsos lehet a szinkronizált férgeket ugyanazzal a táplálékforrással etetni, mint amelyet majd a vizsgálathoz kell használni. A férgeket a vizsgálati hőmérsékleten, 20 ± 2 °C-on kell tartani. A regenerációs időszak után az enyhe mechanikai inger hatására aktív úszást vagy mászást mutató ép, teljes férgeket kell felhasználni a vizsgálathoz. A sérüléseket vagy a férgek autotómiáját meg kell akadályozni, pl. a férgek kezeléséhez tűzcsiszolt pipettát vagy rozsdamentes acél fogászati szondát használva.

A *Lumbriculus variegatus* starterkultúrájának forrásai (az egyesült államokbeli címek a (4) irodalomból átvéve)

Európa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Németország

Bayer Crop Science AG
Development – Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Németország

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finnország

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Németország

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

Egyesült Államok

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

HIVATKOZÁSOK

(1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(5) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(6) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

(10) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

(11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

▼M6

6. függelék

A körvizsgálat eredményeinek összegzése

„*Lumbriculus varieatuson* végzett üledéktoxicitási vizsgálat”

1. táblázat

Az egyes körvizsgálati futtatások eredményei: A férgek átlagos száma a kontrollokban és az oldószeres kontrollokban a vizsgálat végén; SD = standard eltérés; CV = variációs együttható.

	férgek átlagos száma a kontrollokban	SD	CV (%)	n	férgek átlagos száma az oldószer kontrollokban	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
laboratóriumok közötti átlagérték	**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

2. táblázat

Az egyes körvizsgálati futtatások eredményei: A férgek átlagos összes száraz tömege ismétlésenként a kontrollokban és az oldószeres kontrollokban a vizsgálat végén; SD = standard eltérés; CV = variációs együttható.

	férgek összes száraz tömege ismétlésenként (kontrollok)	SD	CV (%)	n	férgek összes száraz tömege ismétlésenként (oldószer kontrollok)	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
laboratóriumok közötti átlagérték	**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

3. táblázat

A PCP toxicitása: A körvizsgálat végpontjainak összegzése; az EC50, a NOEC és a LOEC laboratóriumok közötti átlagértéke; SD = standard eltérés; CV = variációs együttható.

biológiai paraméter		Laboratóriumok közötti átlagérték (mg/kg)	min.	max.	Laboratóriumok közötti faktor	SD	CV (%)	mértani átlag (mg/kg)
a férgek összes száma	**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				
a férgek összes száraz tömege	**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				
mortalitás/ túlélési arány	**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
szaporodás (a férgek számának növekedése ismétlésenként)	**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				
növekedés (az élőanyagtömeg növekedése ismétlésenként)	**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: legkisebb kimutatható különbség a kontroll értékekhez viszonyítva a hipotézisvizsgálat alatt; a statisztikai erő mértékeként használják

HIVATKOZÁS

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. RAGADOZÓ ATKA (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*) SZAPORODÁSÁNAK VIZSGÁLATA TALAJBAN

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 226. vizsgálati iránymutatásában (2008) leírt módszerrel. A vizsgálati módszer célja a talajba kerülő vegyi anyagoknak a *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) talajlakó atkafaj szaporodási teljesítményére kifejtett hatásainak értékelése, ami lehetővé teszi a fajlagos populációnövekedési sebességre gyakorolt gátló hatás becslését (1,2). A szaporodási teljesítmény itt a fiatal egyedek számát jelenti a vizsgálati időszak végén. A *H. aculeifer* egy további táplálkozási szintet képvisel azokhoz a fajokhoz viszonyítva, amelyek tekintetében a vizsgálati módszerek már rendelkezésre állnak. E vizsgálati módszer céljaira a szaporodási ciklus különböző szakaszainak hátrányos megkülönböztetése és számszerűsítése nélküli szaporodási vizsgálatot tekintik megfelelőnek. A talajon keresztüli expozíciótól eltérő expozíciós forgatókönyv szerint működő vegyi anyagok esetében más megközelítések lehetnek megfelelőek (3).

2. A *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* fajt a talajfauna, és különösen a ragadozó atkák fontos képviselőjének tekintik. Világszerte elterjedt (5), könnyű gyűjteni és laboratóriumban tenyészteni. A *H. aculeifer* biológiájának összefoglalója a 7. függelékben található. Az atkafaj ökológiájára és az ökotoxikológiai vizsgálatokban való használatára vonatkozó háttérinformációk rendelkezésre állnak (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

A VIZSGÁLAT ELVE

3. Kifejlett nőstény egyedeket tesznek ki a vizsgált vegyi anyag talajba kevert koncentrációsorozatának. A vizsgálatot ismétlésenként 10 kifejlett nőstény egyeddel kezdik meg. A hímek nem vesznek részt a vizsgálatban, mert a tapasztalat azt mutatja, hogy a nőstények azonnal vagy röviddel a deutonimfa szakaszból való kikelés után párosodnak, ha hímek vannak jelen. Ezen kívül a hímek bevonása meghosszabbítaná a vizsgálatot oly módon, hogy az életkori szakaszok hátrányos megkülönböztetése válna szükségessé. Így a párzás önmagában nem része a vizsgálatnak. A nőstényeket 28–35 nappal azután vonják be a vizsgálatba, hogy peterakás megkezdődött a szinkronizálás során (lásd a 4. függeléket), mivel a nőstényeket ekkor már úgy lehet tekinteni, hogy párosodtak és túljutottak a peterakás előtti szakaszon. 20 °C hőmérsékleten a vizsgálat a nőstények bevonása (0. nap) utáni 14. napon ér véget, ami lehetővé teszi az első kontroll utódok számára, hogy elérjék a deutonimfa szakaszt (lásd a 4. függeléket). A fő mért változóhoz a vizsgálati edényenkénti fiatal egyedek számát és emellett a túlélő nőstények számát határozzák meg. A vizsgált vegyi anyagnak kitett atkák szaporodási teljesítményét összehasonlítják a kontrollokéval, hogy a vizsgálati elrendezéstől függően (lásd a 29. pontot) meghatározzák az ECx (például EC10, EC50) értékét vagy az észlelhető hatást még nem okozó koncentrációt (NOEC) (a definíciókat lásd az 1. függelékben). A vizsgálati ütemtervről a 8. függelék ad áttekintést.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

4. A vizsgált vegyi anyag vízben való oldhatósága, log K_{ow} értéke, talaj-víz megoszlási hányadosa és gőznyomása lehetőleg ismert legyen. Kívánatosak a vizsgált vegyi anyag talajban bekövetkező sorsára vonatkozó további információk, mint például a biotikus és abiotikus lebomlás aránya.

5. Ez a vizsgálati módszer vízben oldható vagy oldhatatlan vegyi anyagok esetében egyaránt használható. A vizsgált vegyi anyag alkalmazás módja azonban ennek megfelelően eltérő lesz. A vizsgálati módszer nem alkalmazható illékony vegyi anyagok esetében, azaz olyan vegyi anyagoknál, amelyek Henry-féle állandója vagy levegő-víz megoszlási hányadosa nagyobb, mint egy, illetve olyan vegyi anyagok esetében, amelyek gőznyomása meghaladja a 0,0133 Pa értéket 25 °C-on.

▼M6

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

6. A kezeletlen kontrolloknak a következő kritériumoknak kell megfelelniük a vizsgálati eredmény érvényességéhez:

— A felnőtt nőstények átlagos mortalitása nem haladhatja meg a 20 %-ot a vizsgálat végén;

— A fiatalok átlagos száma ismétlésenként (10 bevont felnőtt nősténnyel) legalább 50 legyen a vizsgálat végén;

— Az ismétlésenkénti fiatal atkák számának variációs együtthatója nem haladhatja meg a 30 %-ot a meghatározó vizsgálat végén.

REFERENCIA-VEGYIANYAG

7. A referencia-vegyianyag ECx és/vagy NOEC értékét meg kell határozni a megfelelő laboratóriumi vizsgálati körülmények garantálása érdekében, illetve annak ellenőrzésére, hogy a vizsgált szervezetek által adott válasz az idő múlásával nem változott. A dimetoát (CAS 60-51-5) megfelelő referencia-vegyianyag, amelyről kimutatták, hogy befolyásolja a populációméretet (4). A bórsavat (CAS 10043-35-3) alternatív referencia-vegyianyagként lehet használni. Ezzel a vegyi anyaggal kapcsolatban még kevesebb tapasztalatot szereztek. Két elrendezés lehetséges:

— A referencia-vegyianyag az egyes vizsgált vegyi anyagok toxicitásának meghatározásával párhuzamosan vizsgálható egyetlen koncentráción, amelyről egy előzetes dózis-válasz vizsgálatban bizonyítani kell, hogy az utódok > 50 %-os csökkenését eredményezi. Ebben az esetben az ismétlések száma legyen ugyanannyi, mint a kontrollcsoportban (lásd a 29. pontot).

— Alternatív megoldásként a referencia-vegyianyagot évente 1–2 alkalommal vizsgálják egy dózis-válasz vizsgálatban. A választott elrendezéstől függően a koncentrációk és ismétlések száma, valamint az osztásköz különbözik (lásd a 29. pontot), de el kell érni a 10–90 %-os hatást (1,8-es osztásköz). A dimetoát EC_{50}-értékének a fiatal egyedek száma alapján a 3,0 és 7,0 mg/kg talaj (száraz tömeg) közötti tartományba kell esnie. A bórsavval eddig kapott eredmények alapján a fiatal egyedek számán alapuló EC50-értéknek a 100 és 500 mg/kg talaj száraz tömeg közötti tartományba kell esnie.

A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

Vizsgálati edények és berendezések

8. Üvegből vagy más, kémiailag semleges anyagból készített és szorosan illeszkedő fedéllel rendelkező 3–5 cm átmérőjű (talaj magassága ≥1,5 cm) vizsgálati edényeket kell használni. A csavaros fedelek előnyösek; ebben az esetben az edényeket hetente kétszer lehet levegőztetni. Alternatív megoldásként a szubsztrátum és az atmoszféra közötti közvetlen gázcserét lehetővé tevő fedelek (pl. géz) is használhatók. Mivel a nedvességtartalmat a vizsgálat során elég magasan kell tartani, a vizsgálat során ellenőrizni kell az egyes vizsgálati edények tömegét, és szükség esetén fel kell őket tölteni vízzel. Ez különösen fontos lehet, ha nem áll rendelkezésre csavaros fedő. Ha nem átlátszó vizsgálati edényt használnak, a fedélnek olyan anyagból kell lennie, amely lehetővé teszi a fényhez való hozzáférést (pl. egy perforált átlátszó fedél útján), miközben megakadályozza az atkák elszökését. A vizsgálati edény mérete és típusa függ a kiemelési eljárástól (részletekért lásd az 5. függeléket). Ha hővel történő kiemelést végzünk közvetlenül a vizsgálati edényen, akkor megfelelő lyukbőségű alsó hálót lehet rátenni (a kiemelésig le kell zárni), és a talajnak megfelelő mélységűnek kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye a hőmérsékleti és nedvesség gradienst.

▼M6

9. Standard laboratóriumi felszerelések, így különösen a következők szükségesek:

— lehetőleg üvegedények csavaros fedéllel;

— szárítószekrény;

— sztereomikroszkóp;

— kefék az atkák átvitelére

— pH-mérő és megvilágításmérő;

— megfelelő pontos mérlegek;

— megfelelő hőmérsékletszabályozó eszközök;

— megfelelő páratartalomszabályozó eszközök (nem szükségesek, ha az expozíciós edények fedéllel le vannak fedve);

— szabályozott hőmérsékletű inkubátor vagy kis szoba;

— eszközök a kiemeléshez (lásd az 5. függeléket) (13)

— mennyezeti lámpa fényszabályozóval

— gyűjtőüvegek a kiemelt atkák számára.

A mesterséges talaj előkészítése

10. Ehhez a vizsgálathoz mesterséges talajt használnak. A mesterséges talaj a következő komponensekből áll (minden érték a száraz tömegen alapul):

— 5 % tőzegmoha, levegőn szárított és finomra őrölt (a 2±1 mm-es részecskeméret elfogadható);

— 20 % kaolinagyag (lehetőleg 30 % feletti kaolinittartalommal);

— körülbelül 74 % levegőn szárított ipari homok (a szükséges $CaCO_3$ mennyiségétől függően), túlnyomórészt finom homok, amelyben a részecskék több mint 50 %-a 50–200 mikron méretű. A homok pontos mennyisége a $CaCO_3$ mennyiségétől függ (lásd alább), együtt 75 %-ot kell kiadniuk.

— < 1,0 % kalcium-karbonát ($CaCO_3$, porított, analitikai tisztaságú) pH = 6,0 ± 0,5 eléréséhez; a hozzáadandó kalcium-karbonát mennyisége elsősorban a tőzeg minőségétől/jellegétől függ (lásd az 1. megjegyzést).

1. megjegyzés: A $CaCO_3$ szükséges mennyisége a talajszubsztrátum komponenseitől függ, és a talaj részminták pH-jának mérésével kell meghatározni közvetlenül a vizsgálat előtt.

2. megjegyzés: A mesterséges talaj tőzegtartalma eltér a talajban élő szervezetekkel végzett más vizsgálati módszerektől, ahol a legtöbb esetben 10 % tőzeget használnak (pl. (15)). Az EPPO (16) szerint azonban a tipikus mezőgazdasági talaj legfeljebb 5 % szerves anyagot tartalmaz, és a tőzegtartalom csökkentése így visszatükrözi a természetes talaj csökkent lehetőségeit a vizsgált vegyi anyag szerves szénen történő szorpciójára.

3. megjegyzés: Ha szükséges (például specifikus vizsgálatok céljából), a nem szennyezett területekről származó természetes talajok is szolgálhatnak vizsgálati és/vagy tenyésztéshez használt szubsztrátumként (3). Ha azonban természetes talajt alkalmaznak, akkor azt legalább a következő információkkal kell jellemezni: eredet (gyűjtőhely), pH, textúra (szemcseméret-eloszlás) és szervesanyag-tartalom. Ha rendelkezésre áll, a talaj talajosztályozás szerinti típusát és nevét is bele kell venni, és a talaj legyen mentes minden szennyeződéstől. Abban az esetben, a vizsgált vegyi anyag fém vagy szerves

▼M6

fém, a természetes talaj kationcserélő kapacitását (CEC) szintén meg kell határozni. Különös figyelmet kell fordítani arra, hogy megfeleljenek az érvényességi kritériumoknak, mivel a természetes talajokra vonatkozó háttérinformációk általában ritkák.

11. A talaj száraz összetevőit alaposan összekeverik (például nagyüzemi méretű laboratóriumi keverőgéppel). A pH-érték meghatározása céljából a talajból és 1 mólos kálium-klorid (KCl) vagy 0,01 mólos kalcium-klorid ($CaCl_2$) oldatból készült 1:5 arányú keveréket használnak (lásd a (14) irodalmat és a 3. függeléket). Ha a talaj az elvárt tartománynál savasabb (lásd a 10. pontot), a pH-t megfelelő mennyiségű $CaCO_3$ hozzáadásával lehet beállítani. Ha a talaj túl lúgos, a 11. pontban leírt első három összetevőből álló – $CaCO_3$ nélkül készített – keverék hozzáadásával lehet beállítani.

12. A mesterséges talaj maximális víztartó képességét (WHC) a 2. függelékében leírt eljárásokkal összhangban kell meghatározni. 2–7 nappal a vizsgálat megkezdése előtt a száraz mesterséges talajt előnedvesíteni kell annyi ionmentesített víz hozzáadásával, hogy a végső víztartalom (a WHC 40–60 %-a) körülbelül felét lehessen elérni. A nedvességtartalmat a maximális WHC 40–60 %-ára kell beállítani a vizsgált vegyi anyag oldatának és/vagy desztillált vagy deionizált víz hozzáadásával (lásd a 16–18. pontot). A talaj nedvességtartalmának durva ellenőrzésére alkalmas további elvégzendő módszer, ha enyhén megnyomja a talajt a kezében, és ha a nedvességtartalom megfelelő, kis vízcseppeknek kell megjelennie az ujjai között.

13. A talaj nedvességtartalmát a vizsgálat elején és végén az ISO 11465 (17) szabványnak megfelelően, a talaj pH értékét pedig a 3. függelék vagy az ISO 10390 (14) szabvány szerint határozzák meg. Ezeket a méréseket további atka nélküli mintákon kell elvégezni, amelyeket a kontroll talajból és az egyes vizsgálati koncentrációk talajából kell venni. A talaj pH-értéke nem módosítható, ha savas vagy lúgos vegyi anyagot tesztelnek. A nedvességtartalmat az egész vizsgálat során ellenőrizni kell az edények időközönként történő mérlegelése útján (lásd a 20. és 24. pontot).

A vizsgálati állatok kiválasztása és előkészítése

14. A vizsgálatban felhasznált faj a Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer (Canestrini, 1883). Egy szinkronizált csoportból vett felnőtt nőstény atkákra van szükség a vizsgálat indításához. Az atkákat kb. 7–14 nappal a felnőtté válás után kell bevezetni, azaz 28–35 nappal azután, hogy a peterakás megkezdődött a szinkronizálás során (lásd a 3. és 4. függeléket). Az atkák forrását vagy szállítóját, valamint a laboratóriumi tenyészet fenntartásának módját jegyzőkönyvezni kell. Ha a laboratóriumi tenyészetet tartanak fenn, javasolt legalább évente egyszer beazonosítani a fajt. Az azonosító lapot a 6. függelék tartalmazza.

A vizsgálati koncentrációk előkészítése

15. A vizsgált vegyi anyagot be kell keverni az talajba. A talajnak a vizsgált vegyi anyaggal való kezelését elősegítő szerves oldószerek kiválasztásakor az atkákra gyakorolt csekély toxicitásból kell kiindulni, és a vizsgálati elrendezésnek megfelelő oldószerkontrollt is tartalmaznia kell (lásd a 29. pontot).

Vízben oldódó vegyi anyagok

16. A vizsgált vegyi anyagból ionmentesített vízben olyan mennyiségű oldatot kell készíteni, amely egy vizsgálati koncentráció összes ismétléséhez elegendő. Javasolt a kívánt nedvességtartalom (azaz a maximum WHC 40–60 %-a) eléréséhez szükséges mennyiségű vizet használni (lásd a 12. pontot). A vizsgált vegyi anyag mindegyik oldatát alaposan össze kell keverni egy tétel előnedvesített talajjal a vizsgálati edénybe történő behelyezés előtt.

▼M6

Vízben oldhatatlan vegyi anyagok

17. Vízben oldhatatlan, de szerves oldószerekben oldódó vegyi anyagok esetében a vizsgált vegyi anyagot fel lehet oldani a megfelelő hordozó (például aceton) lehető legkisebb mennyiségében. Csak illékony oldószereket szabad használni. Amikor ilyen hordozókat használnak, minden vizsgált koncentrációnak és a kontrollnak is a hordozó azonos minimális mennyiségét kell tartalmaznia. A hordozót rápermetezik vagy összekeverik kis mennyiségű (például 10 g) finom kvarchomokkal. A szubsztrátum teljes homoktartalmát korrigálni kell ezzel a mennyiséggel. A hordozót elszívó fülkében legalább egy órán keresztül történő párologtatással eltávolítják. A kvarchomok és a vizsgált vegyi anyag e keverékét hozzáadják az előnedvesített talajhoz, és alaposan elkeverik megfelelő mennyiségű ionmentesített vízzel úgy, hogy a szükséges nedvességtartalmat kapják. A végtermékként kapott keveréket töltse be a vizsgálati edényekbe. Vegye figyelembe, hogy egyes oldószerek toxikus lehetnek az atkákra. Ezért ajánlott egy hordozó nélküli kiegészítő vizes kontrollt használni, ha az oldószer atkákkal szembeni toxicitása nem ismert. Ha megfelelően bizonyított, hogy az oldószernek (az alkalmazandó koncentrációkban) nincs hatása, a vizes kontrollt el lehet hagyni.

Vízben és szerves oldószerekben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok

18. Vízben és szerves oldószerekben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok esetén a kívánt vizsgálati koncentráció eléréséhez vizsgálati edényenként 2,5 g finomra őrölt kvarchomokot (például 10 g finom kvarchomokot négy ismétléshez) kevernek össze a vizsgált vegyi anyag megfelelő mennyiségével. A szubsztrátum teljes homoktartalmát korrigálni kell ezzel a mennyiséggel. A kvarchomok és a vizsgált vegyi anyag e keverékét hozzáadják az előnedvesített talajhoz, és megfelelő mennyiségű ionmentesített víz hozzáadása után alaposan elkeverik úgy, hogy a szükséges nedvességtartalmat eredményezze. A végtermékként kapott keveréket elosztják a vizsgálati edények között. Az eljárást megismétlik minden egyes vizsgált koncentráció esetében és egy megfelelő kontrollt is készítenek.

AZ ELJÁRÁS

Vizsgálati csoportok és kontrollok

19. Minden kontroll és kezelt edény esetében tíz felnőtt nőstény ajánlott 20 g száraz tömegű mesterséges talajban. A vizsgált organizmusokat a végső vizsgálati szubsztrátum előállítása után két órán belül hozzá kell adni (azaz a vizsgált vegyi anyag bevitele után). Meghatározott esetekben (pl. ha az öregedés meghatározó tényezőnek tekinthető) a végső vizsgálati szubsztrátum elkészítése és az atkák hozzáadása közötti idő meghosszabbítható (az ilyen öregedésre vonatkozó információkat lásd a (18) szakirodalmi hivatkozásban). Ilyen esetekben azonban tudományos indoklást kell adni.

20. Az atkák talajhoz való hozzáadása után az atkák táplálékot kapnak, és meg kell mérni az egyes edények kezdeti tömegét, amelyet referenciaként kell használni talaj nedvességtartalmának a 24. pontban leírtak szerinti ellenőrzéséhez az egész vizsgálat során. A vizsgálati edényeket ezután a 8. pontban leírtak szerint le kell fedni és elhelyezni a vizsgálati kamrában.

21. Megfelelő kontrollt készítenek a vizsgált vegyi anyag alkalmazásának 15–24. pontban leírt minden módszeréhez. A korábban leírt vonatkozó eljárásokat követik a kontrollok elkészítése során is, kivéve, hogy a vizsgált vegyi anyagot nem adják hozzá. Így adott esetben a kontrollokban a kezelésekkel megegyező koncentrációban/mennyiségben szerves oldószereket, kvarchomokot vagy más hordozókat alkalmaznak. Ha oldószert vagy egyéb hordozót használnak a vizsgált vegyi anyag hozzáadásához, további kontrollt kell készíteni, amely nem tartalmazza a hordozót és a vizsgált vegyi anyagot, és amelyet meg kell vizsgálni, ha az oldószer toxicitása nem ismert (lásd a 17. pontot).

▼M6

Vizsgálati körülmények

22. A vizsgálati hőmérsékletnek 20 ± 2 °C-nak kell lennie. Hőmérséklet legalább naponta fel kell jegyezni, és szükség esetén be kell állítani. A vizsgálatot ellenőrzött világos-sötét ciklusok szerint végzik (lehetőleg 16 óra világos és 8 óra sötét), 400–800 lux megvilágítással a vizsgálati edények környezetében. Az összehasonlíthatóság érdekében ezek a feltételek megegyeznek az egyéb talaj ökotoxikológiai vizsgálatok feltételeivel (pl. (15)).

23. Ha csavaros fedelet használnak, a gázcserét a vizsgálati edények legalább hetente kétszer történő levegőztetésével kell biztosítani. Ha gézfedelet használnak, különös figyelmet kell fordítani a talaj nedvességtartalmának fenntartására (lásd a 8. és a 24. pontot).

24. A talajszubsztrátum víztartalmát a vizsgálati edényekben az egész vizsgálat alatt úgy tartják fenn, hogy rendszeres időközönként újra lemérik a vizsgálati edényeket (pl. hetente egyszer), és pótolják a hiányzó vizet. A veszteségeket szükség esetén ionmentesített vízzel pótolják. A nedvességtartalom a vizsgálat során nem térhet el több mint 10 %-kal a kezdeti értéktől.

Táplálás

25. A sajt atkákról (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)) kimutatták, hogy alkalmas táplálékforrások. A kis ugróvillások (pl. fiatal Folsomia candida Willem, 1902 vagy Onychiurus fimatus (19), (20), televényférgek (pl. Enchytraeus crypticus Westheide & Graefe, 1992) vagy fonalférgek (pl. Turbatrix silusiae de Man, 1913)) is alkalmasak lehetnek (21). Javasolt a vizsgálatban történő használat előtt ellenőrizni a táplálékot. A táplálék típusának és mennyiségének megfelelő számú fiatal egyedet kell biztosítania az érvényességi kritériumok teljesítése érdekében (6. pont). A zsákmányállatok kiválasztása során a vizsgált vegyi anyag hatásmódját is figyelembe kell venni (pl. az atkaölő szerek mérgezőek lehetnek a táplálékatkákra is, lásd a 26. pontot).

26. A táplálékot *ad libitum* kell biztosítani (azaz minden alkalommal egy kis mennyiséget (spatulahegynyit)). E célból alacsony szívóerejű szippantó (az ugróvillásokkal végzett vizsgálatban javasoltak szerint) vagy finom ecset is használható. Általában elegendő a vizsgálat elején, majd hetente két-három alkalommal táplálékot adni. Amikor a vizsgált vegyi anyag toxikusnak tűnik a zsákmányállatokra, mérlegelni kell a táplálási sebesség növelését és/vagy alternatív táplálékforrás használatát.

A vizsgálati koncentrációk kiválasztása

27. A vizsgált vegyi anyag toxicitásának előzetes ismerete (pl. dózisbehatároló vizsgálatokból) segít a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásában. Szükség esetén dózisbehatároló vizsgálatot kell végezni a vizsgált vegyi anyag öt koncentrációjával a 0,1–1 000 mg/kg száraz talaj tartományban, a kezelések és a kontroll esetében is legalább egy ismétlést alkalmazva. A dózisbehatároló vizsgálat időtartama 14 nap, amely után meghatározzák a kifejlett atkák mortalitását és a fiatalok számát. A meghatározó vizsgálat koncentrációtartományát lehetőleg úgy kell megválasztani, hogy az magában foglalja azokat a koncentrációkat, amelyek hatással vannak a fiatal egyedek számára, de az anyai generáció túlélési arányát nem befolyásolják. Ez azonban nem lehetséges olyan vegyi anyagok esetében, amelyek csaknem megegyező koncentrációban okoznak letális vagy szubletális hatásokat. A vizsgálat során alkalmazott koncentrációknak le kell fedniük a hatáskoncentrációt (például EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) és azt a koncentrációtartományt, amelyen belül a vizsgált vegyi anyag érdeklődésre számot tartó hatással rendelkezik. A vizsgálati szervezeteket befolyásoló legalacsonyabb koncentrációnál jóval alacsonyabb vagy a legnagyobb vizsgált koncentrációt meghaladó extrapolációt csak kivételes esetekben szabad végezni, és erre részletes magyarázatot kell adni a jelentésben.

Kísérleti elrendezés

Dózis-válasz vizsgálatok

28. Egy másik körvizsgálatából (televényféreg reprodukciós vizsgálat) származó ajánlások alapján három vizsgálati elrendezést javasolnak (22). Az

▼M6

elrendezések általános alkalmasságát a *H. aculeifer* érvényességi vizsgálatának eredménye is megerősítette.

29. A koncentrációk meghatározása során az alábbiakat kell szem előtt tartani:

— Az EC_x (például EC_{10}, EC_{50}) meghatározásához tizenkét koncentrációt kell vizsgálni. Minden egyes kísérleti koncentráció esetében legalább két ismétlést és hat kontroll ismétlést javasolnak. A szomszédos koncentrációk aránya változtatható, azaz a várt hatástartományban legfeljebb 1,8-re, a magasabb és az alacsonyabb koncentrációknál 1,8-nél nagyobb értékre vehető fel.

— A NOEC meghatározásához mértani sorozatba rendezett legalább öt koncentrációt kell vizsgálni. Minden egyes kísérleti koncentráció esetében négy ismétlést plusz nyolc kontrollt javasolnak. A szomszédos koncentrációk aránya nem lehet 2,0-nél nagyobb.

— Egy kombinált módszer lehetővé teszi mint a NOEC, mind az EC_x meghatározását. Nyolc kezelési koncentrációt kell használni mértani sorozatban. Kezelésenként négy ismétlés plusz nyolc kontroll ajánlott. A szomszédos koncentrációk aránya nem lehet 1,8-nél nagyobb.

Határérték-vizsgálat

30. Ha a dózisbehatároló vizsgálat során nem figyelhető meg hatás a legmagasabb koncentrációban (azaz az 1 000 mg/kg talaj száraz tömeg), a meghatározó reprodukciós vizsgálatot határérték-vizsgálatként lehet elvégezni az 1 000 mg/kg talaj száraz tömeg vizsgálati koncentráció használatával. A határérték-vizsgálat lehetőséget nyújt annak bizonyítására, hogy a szaporodásra vonatkozó NOEC vagy EC_{10} magasabb a határérték-koncentrációnál, miközben minimálisra csökkenthető a vizsgálatnál használt atkák száma. Nyolc ismétlést kell használni mind a kezelt talaj, mind a kontroll esetében.

A teszt időtartama és a mérések

31. A kontroll és a kezelt edényekben lévő atkák viselkedése és morfológiája között megfigyelt különbségeket fel kell jegyezni.

32. A 14. napon a túlélő atkákat kiemeljük a talajból hővel/fénnyel történő extrakcióval vagy más megfelelő módszerrel (lásd az 5. függeléket). A fiatal egyedeket (azaz a lárvákat, protonimfákat és deutonimfákat) és felnőtt atkákat külön-külön számolják meg. Az ebben az időben fel nem lelhető atkákat elhullottnak kell tekinteni, feltételezve, hogy az ilyen atkák az értékelés előtt elpusztultak és lebomlottak. A kiemelés hatásfokát évente egyszer vagy kétszer hitelesíttetni kell ismert számú felnőtt és fiatal egyedet tartalmazó kontrollokban. A hatékonyságnak átlagban 90 % felett kell lennie az összes fejlődési szakasz tekintetében kombináltan (lásd az 5. függeléket). A felnőtt és fiatal egyedek számát nem korrigálják a hatékonysággal.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

33. A vizsgálati eredmények elemzésére használható statisztikai módszerekre vonatkozó információ a 36–41. pontban található. Ezen kívül az „Aktuális megközelítések a ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató” című 54. számú OECD-dokumentumot (31) kell tanulmányozni.

34. A vizsgálat fő végpontja a reprodukciós teljesítmény, ami itt az előállított fiatal egyedek száma ismétlésenként (10 bevont felnőtt nősténnyel). A statisztikai elemzés megköveteli a reprodukciós teljesítmény számtani középértékének (X) és varianciájának (s^2) kiszámítását kezelésenként és

▼M6

kontrollonként. Az X és s^2 értéket az ANOVA eljárásokhoz használják (mint például a Student-féle t-próba, a Dunnett-féle próba, vagy a Williams-féle próba), valamint a 95 %-os konfidenciaintervallumok kiszámításához.

Megjegyzés: Ez a fő végpont egyenértékű a fekunditással, amelyet úgy mérnek, hogy a vizsgálat során nemzett élő fiatal egyedek számát elosztják a vizsgálat kezdetekor bevont anyaállatok számával.

35. A túlélő nőstények száma a kezeletlen kontrollokban fontos érvényességi feltétel és dokumentálni kell. A dózisbehatároló vizsgálathoz hasonlóan minden más káros jelet is kell tüntetni a végleges jelentésben.

ECx

36. A 34. pontban leírt paraméterre vonatkozó ECx-értékeket, beleértve a hozzájuk tartozó alsó és felső 95 %-os megbízhatósági határokat, megfelelő statisztikai módszerekkel számítják ki (pl. probit analízis, logisztikai vagy Weibull-függvény, vágott Spearman-Karber módszer vagy egyszerű interpoláció). Az EC_x-értéket úgy kapják meg, hogy a kapott egyenletbe beillesztenek egy értéket, amely megfelel a kontroll átlaga x %-ának. Az EC50 vagy bármely más EC_x kiszámításához a kezelésenkénti átlagokat (X) regressziós elemzésnek kell alávetni.

NOEC/LOEC

37. Ha a statisztikai elemzés célja a NOEC/LOEC meghatározása, edényenkénti statisztikákra (az egyes edények ismétlésnek minősülnek) van szükség. Az „Aktuális megközelítések a ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató” című 54. számú OECD-dokumentum szerinti megfelelő statisztikai módszereket kell alkalmazni. Általában a vizsgált vegyi anyag kontrollal összehasonlítva mutatott káros hatásait egyoldali (kisebb) hipotézisvizsgálattal vizsgálják meg ($p \leq 0,05$). A példákat lásd a következő pontokban.

38. Az adatok normál eloszlását például a Kolmogorov-Szmirnov illeszkedés próbával, a tartomány-szórás arány próbával (R/S próba), vagy a Shapiro–Wilk-próbával (kétoldalas, $p \leq 0,05$) lehet vizsgálni. A Cochran-próbát, a Levene-próbát vagy a Bartlett-próbát (kétoldalas, $p \leq 0,05$) lehet használni a szóráshomogenitás vizsgálatára. Ha a paraméteres vizsgálati eljárások előfeltételei (normalitás, szórás homogenitás) teljesülnek, egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA), majd ezt követően többszörös összehasonlító próbákat lehet végezni. Többszörös összehasonlítást (pl. Dunnett-féle t-próba), vagy lépésenkénti trendvizsgálatot (pl. Williams-féle próba monoton dózis-válasz összefüggés esetén) lehet használni annak kiszámítására, hogy vannak-e szignifikáns különbségek ($p \leq 0,05$) a kontroll és a vizsgált vegyi anyag különböző koncentrációi között (az ajánlott próba kiválasztása az „Aktuális megközelítések a ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató” című 54. számú OECD-dokumentum szerint történjen). Ellenkező esetben nemparaméteres módszereket (pl. a Holm szerint módosított Bonferroni-féle U-próbát vagy a Jonckheere–Terpstra-féle trendpróbát) kell használni a NOEC és a LOEC meghatározására.

Határérték-vizsgálat

39. Ha határérték-vizsgálatot (a kontroll és egyetlen kezelés összehasonlítása) végeztek, és a paraméteres vizsgálati eljárások előfeltételei (normalitás, homogenitás) teljesülnek, a metrikus válaszokat a Student-féle próbával (t-próba) lehet értékelni. Ha a feltételek nem teljesülnek, akkor a nem egyenlő szórásnégyzeteket feltételező t-próba (Welch-féle t-próba) vagy egy nemparaméteres próba, például a Mann-Whitney-féle U-próba alkalmazható.

40. A kontrollok (kontroll és oldószer kontroll) közötti szignifikáns különbségek meghatározása céljából az egyes kontrollok ismétléseit a határérték-vizsgálatnál leírtak szerint kell vizsgálni. Ha ezek a tesztek nem mutatnak ki

▼M6

szignifikáns eltérést, a kontroll és az oldószer kontroll ismétléseit össze lehet vonni. Ellenkező esetben az összes kezelést az oldószer kontrollal kell összehasonlítani.

Vizsgálati jegyzőkönyv

41. A vizsgálati jegyzőkönyvnek legalább a következőket kell tartalmaznia:

— *Vizsgált vegyi anyag*

— a vizsgált vegyi anyag azonosítása, név, tételszám, CAS-szám, tisztaság;

— a vizsgált vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságai (pl. log K_{ow}, vízoldhatóság, gőznyomás, Henry-állandó (H), valamint a vizsgált anyag sorsára vonatkozó esetleges információk).

— *A vizsgálathoz használt organizmusok*

— a vizsgálati organizmusok azonosítása és szállítója, a tenyésztési körülmények leírása;

— a vizsgált szervezetek kortartománya.

— *Vizsgálati körülmények*

— a kísérleti terv és eljárások leírása.

— a vizsgálati talaj előkészítésének adatai; részletes specifikáció, ha természetes talaj használnak (eredet, történelem, szemcseméret-eloszlás, pH, szervesanyag-tartalom és – ha rendelkezésre áll – a talaj besorolása)

— a talaj maximális víztartó képessége;

— a vizsgált anyag talajba történő bejuttatására szolgáló technika bemutatása;

— a vizsgált vegyi anyag bejuttatásához használt kisegítő vegyi anyagokra vonatkozó részletek;

— a vizsgálati edények mérete és a vizsgálati talaj száraz tömege edényenként;

— vizsgálati körülmények: fényerő, világos-sötét ciklusok időtartama, hőmérséklet;

— az etetési rend leírása, a a vizsgálatban használt eledel típusa és mennyisége, etetési dátumok;

— a talaj pH-ja és víztartalma a vizsgálat elején és alatt.(kontroll és kezelések)

— a kiemelési eljárás részletes leírása és a kiemelés hatásfoka.

— *Vizsgálati eredmények*

— az előállított fiatal egyedek száma az egyes vizsgálati edényekben a vizsgálat végén;

— az felnőtt nőstény egyedek száma és a felnőtt egyedek mortalitása (%) az egyes vizsgálati edényekben a vizsgálat végén;

— a nyilvánvaló tünetek, illetve a jól megfigyelhető magatartásbeli változások leírása;

— a referencia-vegyianyaggal kapott eredmények;

— összesítő statisztikák (ECx és/vagy NOEC), beleértve a 95 %-os megbízhatósági határokat és a számítási módszer leírását;

▼**M6**

— a koncentráció-válasz kapcsolat ábrázolása;

— az e vizsgálati módszerben leírt eljárásoktól való eltérések és a vizsgálat során bekövetkezett valamennyi szokatlan esemény.

IRODALOM

(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 (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1994). Talajminőség. A pH meghatározása, No. 10390. ISO, Genf.

▼**M6**

(15) E melléklet C.8. fejezete: Földigilisztákra kifejtett toxicitás..

(16) EPPO (2003): EPPO szabványok. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.

(17) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1993). Talajminőség. A szárazanyag és a víztartalom meghatározása tömeg alapján – Gravimetriás módszer, No. 11465. ISO, Genf.

(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) E melléklet C.32. fejezete: Televényférgek szaporodásának vizsgálata.

(23) ISO (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) (1994). Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földigilisztákra (*Eisenia fetida*). 2. rész: A szaporodásra gyakorolt hatások meghatározása, No. 11268-2. ISO, Genf.

(24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.

(25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.

(26) Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with „good genes" in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.

(27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.

(28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

(29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11-59.

(30) Kevan, D.K. McE. and Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of Hypoaspis aculeifer (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). Acarologia 6, 647-658.

(31) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18

▼M6

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

E vizsgálati módszerben a következő fogalommeghatározások alkalmazandók (ebben a vizsgálatban valamennyi hatáskoncentráció a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálat talaj száraz tömegének hányadosában van kifejezve):

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

NOEC (megfigyelhető hatást nem koncentráció) a vizsgált vegyi koncentráció, amelyben nem figyelhető meg hatás. Ebben a vizsgálatban a NOEC-nek megfelelő koncentrációnak nincs statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$) az adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva.

LOEC (észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon legalacsonyabb koncentrációja, amelynek még statisztikailag szignifikáns hatása van ($p < 0,05$) egy adott expozíciós időtartamon belül a kontrollal összehasonlítva.

EC_x (hatáskoncentráció x % hatás eléréséhez): az a koncentráció, amely valamely hatás x %-át okozza a vizsgálati szervezetekben egy adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva. Például az EC_{50} az a becsült koncentráció, amely a vizsgálat valamilyen végpontja tekintetében a kitett populáció 50 %-ában okoz hatást a meghatározott expozíciós idő alatt.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼**M6**

2. függelék

A talaj maximális víztartó képességének meghatározása

A talaj maximális víztartó képességének meghatározására szolgáló alábbi módszert találják megfelelőnek. Leírása az ISO DIS 11268-2 C. mellékletében található (Talajminőség. A szennyező anyagok hatása földigilisztákra (*Eisenia fetida*). 2. rész: A szaporodásra gyakorolt hatások meghatározása (23)).

Gyűjtsön össze meghatározott mennyiségű (pl. 5 g) vizsgálati táptalajt alkalmas mintavételi eszköz (csigás cső stb.) segítségével. Fedje le a cső alját egy darab szűrőpapírral, töltse meg vízzel, majd tegye egy vízfürdőben elhelyezett állványra. A csövet fokozatosan víz alá kell meríteni addig, amíg a víz szintje a talaj teteje fölé nem emelkedik. Ezután a csövet a vízben kell hagyni körülbelül három órán keresztül. Mivel nem lehet a talaj hajszálereibe felszívódott minden vizet benntartani, a talajmintát hagyni kell lecsepegni két órán keresztül úgy, hogy a csövet nagyon vizes finomra őrölt kvarchomokból készített ágyra kell helyezni egy fedett edényben (hogy ne száradjon ki). Az ezután 105 °C-on tömegállandóságig szárított mintát meg kell mérni. A víztartó képességet (WHC) a következők szerint kell kiszámítani:

$$\text{WHC (a száraz tömeg \% – ában)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Ahol:

S = a vízzel telített szubsztrátum + a cső tömege + a szűrőpapír tömege

T = tára (cső tömege + szűrőpapír tömege)

D = a szubsztrátum száraz tömege

▼**M6**

3. függelék

A talaj ph-értékének meghatározása

A talajminták pH-értékének meghatározására szolgáló következő módszer az ISO 10390 „Talajminőség. A pH meghatározása” szabványban található leíráson alapul (16).

A meghatározott mennyiségű talajt szobahőmérsékleten szárítják legalább 12 órán keresztül. Ezután talajszuszpenziót (amely legalább 5 gramm talajt tartalmaz) készítenek ötszörös térfogatú 1 mólos analitikai tisztaságú kálium-klorid (KCl) oldattal vagy 0,01 mólos analitikai tisztaságú kalcium-klorid ($CaCl_2$) oldattal. A szuszpenziót öt percig alaposan rázzák, majd legalább 2 órán át állni hagyják, de nem tovább, mint 24 órán át. Ezután megmérik a folyékony fázis pH-ját pH-mérővel, amelyet minden mérés előtt pufferoldatok megfelelő sorozatával (például pH = 4,0 és 7,0) kalibrálnak.

▼M6

4. függelék

A *Hypoaspis (Geolaelaps) Aculeifer* Felnevelése, Táplálékatkák És A Tenyészet Szinkronizálása

A *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* felnevelése:

A tenyészetek gipsz/szénpor (9:1) keverékével töltött műanyag edényekben vagy üvegpalackokban tarthatók. A gipszet néhány csepp desztillált vagy ionmentesített víz hozzáadásával lehet nedvesen tartani, ha szükséges. A nevelési hőmérséklet optimálisan 20 ± 2 °C, a világos/sötét időszakok váltogatása nem releváns ennek a fajnak az esetében. A prédaállatok lehetnek *Typrophagus putrescentiae* vagy *Caloglyphus* sp. atkák (a táplálékatkákkal óvatosan kell bánni, mert emberben allergiát okozhatnak), de a fonálférgek, televényférgek és ugróvillásak is alkalmasak prédaállatnak. A prédaállatok forrását fel kell jegyezni. A populáció kialakítása kezdődhet egyetlen nősténnyel is, mert a megtermékenyítetlen petékből hímek fejlődnek ki. A generációk nagyrészt átfedik egymást. A nőstények legalább 100 napig élhetnek, és élettartamuk során mintegy 100 petét rakhatnak le. A legnagyobb peterakási arányt 10–40 nap között érik el (a felnőtté válás után), ami 2,2 pete nőstény^{-1} nap^{-1}. A petéből kifejlett nősténnyé fejlődési idő kb. 20 nap 20 °C-on. Több tenyészetet is fenn kell tartani, már a vizsgálatot megelőzően.

A *Typrophagus putrescentiae* felnevelése:

Az atkákat finom sörélesztő porral töltött üvegedényben tartják, amelyet egy KNO_3-oldattal töltött műanyag vödörbe tesznek, hogy elkerüljék az atkák szökését. A táplálékatkákat a por tetejére teszik. Ezt követően egy spatula segítségével gondosan összekeverik őket a porral (amelyet hetente kétszer ki kell cserélni).

A tenyészet szinkronizálása:

A vizsgálatban használandó példányoknak hasonló korúaknak kell lenniük (kb. a kifejlett állapot elérése után 7 nap). Ezt 20 °C tenyésztési hőmérsékleten a következőképpen lehet elérni:

Helyezze át a nőstényeket egy tiszta tenyésztőedénybe, és adjon nekik megfelelő mennyiségű táplálékot

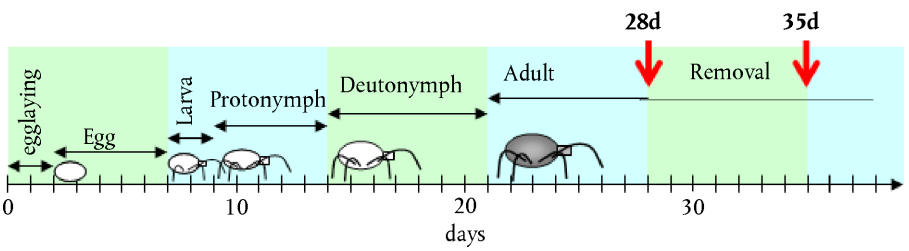
— Hagyja a nőstényeket két-három napon át petéket rakni, majd távolítsa el a nőstényeket

— Az indulást követő 28. és 35. nap között vegye ki a felnőtt nőstényeket a vizsgálathoz, és tegye a felnőtt nőstényeket tiszta tenyésztőedényekbe.

A felnőtt nőstényeket könnyen meg lehet különböztetni a hímektől és más fejlődési szakaszoktól nagyobb testméretük, duzzadt alakjuk és barna hátsó pajzsuk alapján (a hímek karcsúbbak és laposak); az éretlen egyedek fehérek vagy krémszínűek. Az atkák fejlődése megközelítőleg követi az alábbiakban leírt mintát 20 °C-on (ábra): Pete 5 nap, lárva 2 nap, protonimfa 5 nap, deutonimfa 7 nap, peterakás előtti időszak a nőstényeknél 2 nap. Ezt követően az atkák felnőttnek számítanak.

Ábra

A *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* fejlődése 20 °C-on (eltávolítás = a vizsgálatban használt nőstények)



▼**M6**

Az anyaállatok peterakásának megkezdését követő 28. és 35. nap között (azaz 7–14 nappal a felnőtté válás után) a felnőtt vizsgálati állatokat eltávolítjuk a szinkronizált tenyészetből és behelyezzük őket a vizsgálati edénybe. Ezzel biztosítható, hogy a vizsgálati állatok már átestek a peterakás előtti időszakon és párosodtak hím atkákkal, amelyek szintén jelen vannak a tenyésztőedényben. A laboratóriumi tenyészetekben végzett megfigyelések arra utalnak, hogy a nőstények azonnal vagy nem sokkal a felnőtté válás után párosodnak, ha hímek vannak jelen (Ruf, Vaninnen, személyes megfigyelés). A hétnapos időtartam azért megfelelő, mert megkönnyíti a vizsgálat beillesztését a laboratóriumi rutinba és pufferelhető az atkák közötti egyéni fejlődésbeli variabilitás. A peterakást legalább ugyanakkora számú nősténnyel kell megkezdeni, mint amennyi végül is a vizsgálathoz szükséges lesz (ha például 400 nőstény szükséges a vizsgálathoz, akkor legalább 400 nőstényt kell hagyni petét rakni két-három napig). Legalább 1 200 petének kell a szinkronizált populáció kiindulási alapját képeznie (a nemek aránya körülbelül 0,5, a mortalitás körülbelül 0,2). A kannibalizmus elkerülése érdekében legfeljebb 20–30 peterakó nőstényt érdemes egy edényben tartani.

▼M6

5. függelék

Kiemelési módszerek

Mikroízeltlábúak esetében a hővel való extrakció megfelelő módszer a példányok talajtól/szubsztrátumtól történő elválasztására (lásd az alábbi ábrát). A módszer az organizmusok aktivitásán alapul, így csak a mozgó példányok feljegyzésére lesz esély. A hőextrakció alapelve az, hogy fokozatosan lerontjuk a körülményeket az organizmusok számára a mintában, ezért azok elhagyják a szubsztrátumot, és belezuhannak a rögzítőfolyadékba (pl. etanol). A meghatározó szempontok az extrakció időtartama, illetve a jó, közepes és rossz körülmények gradiense az organizmusok számára. Az ökotoxikológiai vizsgálatok céljából végzett extrakció időtartamának a lehető legrövidebbnek kell lennie, mert a kiemelés során bekövetkező populációnövekedés meghamisítaná az eredményeket. Másrészt a minta hőmérséklete és páratartalma mindig abban a tartományban legyen, amely lehetővé teszi az atkák mozgását. A talajminta fűtése a szubsztrátum kiszáradásához vezet. Ha a kiszáradás túl gyors, néhány atka is kiszáradhat, még mielőtt sikerülne elmenekülnie.

Ezért a következő eljárás javasolt (24) (25):

Készülékek: Tullgren-tölcsér vagy hasonló módszerek, mint például a McFadyen (fűtés felülről, a mintát egy tölcsér fölé tesszük)

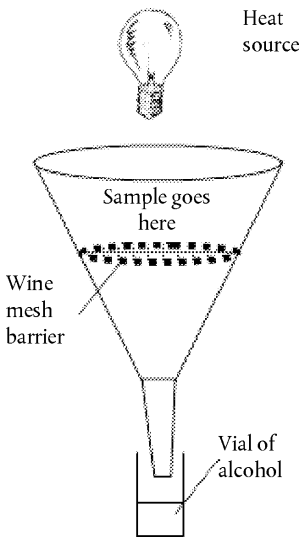
Fűtési rendszer: 25 °C-on 12 órán át, 35 °C-on 12 órán át, 45 °C-on 24 órán át (összesen 48 óra). A hőmérsékletet a szubsztrátumban kell mérni.

Rögzítőfolyadék: 70 %-os etanol

Részletek: Vegyünk egy, a vizsgálat során is használt üvegfiolát. Vegyük le a fedelét, és csavarjunk egy darab hálót vagy szövetet a nyílás köré. A szövetnek 1,0–1,5 mm lyukbőségűnek kell lennie. Rögzítsük az anyagot egy gumiszalaggal. Óvatosan fordítsuk az fiolát fejjel lefelé, és helyezzük az extrakciós készülékbe. A szövet megakadályozza, hogy a szubsztrátum belefolyjon a rögzítőfolyadékba, de lehetővé teszi, hogy az atkák elhagyják a mintát. Miután az összes fiolát behelyeztük, indítsuk el a fűtési rendszert. 48 óra után fejezzük be az extrakciót. Vegyük ki rögzítőfiolákat, és számoljuk meg az atkákat egy preparálómikroszkóppal.

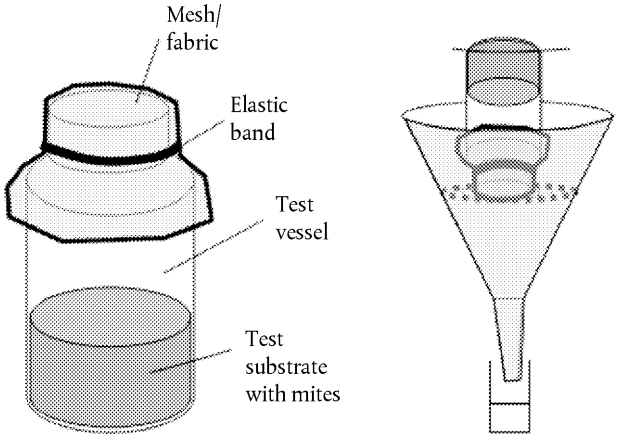
A választott módszer extrakciós hatékonyságát évente egyszer vagy kétszer bizonyítani kell a kezeletlen kontrollszubsztrátumban tartott ismert számú fiatal és felnőtt atkát tartalmazó edények segítségével korábban végzett próbával. A hatékonyságnak átlagban ≥ 90 % mértékűnek kell lennie az összes fejlődési szakasz tekintetében kombináltan.

Tullgren-típusú extrakciós eszköz



▼**M6**

A vizsgálati fiola elkészítése a vizsgálat befejezése után, a kiemelés előtt



▼**M6**

6. függelék

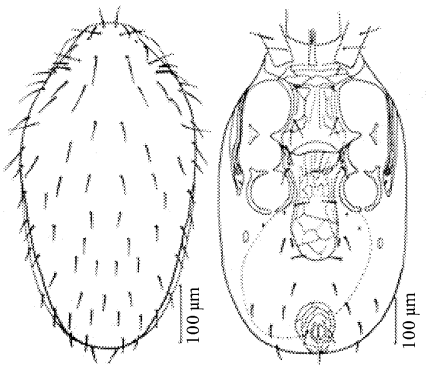
A *hypoaspis (geolaelaps) aculeifer* azonosítása

Alosztály/rend/alrend**:**	Család**:**	Nemzetség/alnemzetség/faj**:**
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

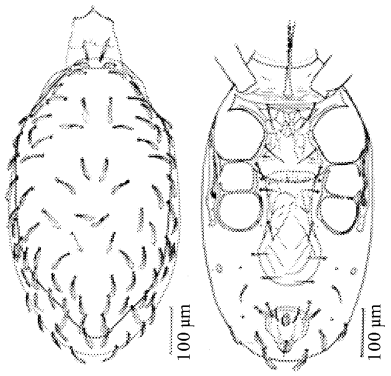
Szerző és dátum:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 2007. január 23.

Irodalomjegyzék:	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.

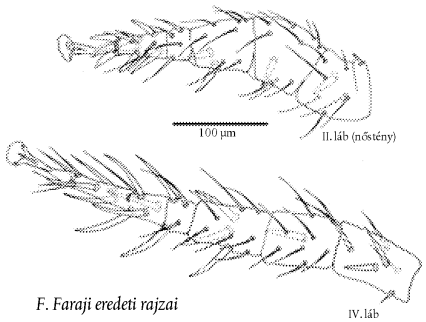
Meghatározó jellemzői:	Tectum lekerekített fogazott peremmel; hypostomális hornyok több mint 6 denticulusszal; a Z4 kaudális dorzális sörtéi nem túl hosszúak; setiform dorzális sörte; genitális pajzs normális, nem túlságosan megnagyobbodott és nem éri el az anális pajzsot; dorzális pajzs hátsó fele páratlan sörte nélkül; II. és IV. láb néhány vastag makrosörtével; Z5 dorzális sörte körülbelül kétszer hosszabb, mint J5; csáprágó rögzített íze 12–14 foggal és mozgatható íze 2 foggal; idiosoma 520–685 μm hosszú. A *Hypoaspis miles* fajt szintén használják a biológiai kontrollban, és össze lehet téveszteni a *H. aculeifer* fajjal. A fő különbség: A *H. miles* a Cosmolaelaps alnemzetségbe tartozik és késszerű dorzális sörtéi vannak, míg a *H. aculeifer* a Geolaelaps alnemzetségbe tartozik és setiform dorzális sörtéi vannak.



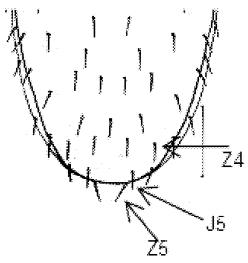
Hypoaspis aculeifer (Hughes, 1976 alapján)



Hypoaspis miles (Hughes, 1976 alapján)



F. Faraji eredeti rajzai



Hypoaspis aculeifer,
hátsó pajzs a fajra jellmző sörtékkel

▼M6

7. függelék

Alapvető információk a *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* biológiájával kapcsolatban

A *Hypoaspis aculeifer* a Lealapidae családba, az Acari (atkák) rendbe, az Arachnida osztályba, az Arthropoda törzsbe tartozik. Mindenféle talajban megél és egyéb atkákkal, fonálférgekkel, televényférgekkel és ugróvillásokkal táplálkozik (26). Táplálékhiány esetében kannibalizmusra vált (27). A ragadozó atkák idiosomára és gnathosomára oszthatók fel. Hiányzik az idiosoma egyértelmű elkülönülése prosomára (fej) és opisthosomára (has). A gnathosoma (fejpajzs) tartalmazza a táplálkozásra szolgáló eszközöket, így a tapogatókat és a cséprágókat. A cséprágók háromfelé ágaznak, és különböző alakú fogakkal vannak felszerelve. A táplálkozás mellett a hímek a cséprágókat elsősorban a spermatofórák nőstényekhez való átvitelére használják. A dorzális pajzs szinte teljesen lefedi az idiosomát. A nőstények idiosomájának nagy részét a reproduktív szervek foglalják el, amelyek különösen röviddel a peterakás előtt jól kivehetőek. Ventrálisan két pajzs található, a sternális és a genitális pajzs. Minden lábon sörték és tövisek vannak. A sörtéket az atkák horgonyként használják, amikor a talajban vagy annak felszínén mozognak. Az első pár lábat főként antennaként használják. A második pár lábat nem csak mozgásra, hanem a zsákmány megszerzésére is használják. A negyedik pár láb tövisei védelmül szolgálhatnak, valamint „mozgató motorként” (28). A hímek 0,55–0,65 mm hosszúak, tömegük 10–15 μg. A nőstények 0,8–0,9 mm hosszúak, tömegük 50–60 μg (8) (28) (1. ábra).

1. ábra

A *H. aculeifer* nősténye, híme, protonimfája és lárvái



23 °C-on az atkák 16 nap után (nőstények), illetve 18 nap után (hímek) válnak nemileg éretté (6). A nőstények a solenostománál veszik át a spermiumokat, ahonnan azután átkerülnek a petefészekbe. A petefészekben a spermiumok beérnek és tárolódnak. A megtermékenyítésre csak a spermiumoknak a petefészekben történő érését követően kerül sor. A megtermékenyített vagy termékenyítetlen petéket a nőstények csomókban vagy külön-külön, lehetőleg hasadékokban vagy lyukakban helyezik el. A párosodott nőstények petéiből mindkét nembe tartozó fiatal egyedek kikelhetnek, míg a nem párosodott nőstényekéből csak hím utódok. A kifejlődés során az atkák négy fejlődési szakaszon (pete–lárva, lárva–protonimfa, protonimfa–deutonimfa, deutonimfa–felnőtt) mennek át.

A pete tejfehér, átlátszó, elliptikus és körülbelül 0,37 mm hosszú, szilárd burokkal. A (8) szakirodalmi hivatkozás szerint a lárvák 0,42–0,45 mm méretűek. A lárváknak csak három pár lába van. A fejrégióban tapogatók és csápok találhatók. A csápokat, amelyeken néhány néhány kis denticulus van, a petéből való kikelésre használják. Az első vedlés után (a kikelés után 1–2 napon belül) kialakulnak a protonimfák. Ezek is fehér színűek, a méretük 0,45–0,62 mm (8), és négy pár lábuk van. A csápokon a fogak teljesen jelen vannak. Ettől a stádiumtól kezdve

▼M6

az atkák táplálkozni kezdenek. Ebből a célból a chelicerákkal csápokkal áttörik a prédaállat ckutikuláját, és a bélrendszeren kívüli emésztést szolgáló szekrétumot bocsátanak a prédaállatba. A táplálékmasszát azután az atka kiszippantja. A csápok arra is használhatók, hogy nagyobb részeket tépjenek ki a táplálékdarabokból (28). Egy további vedlést követően kialakulnak a deutonimfák. Ezek 0,60–0,80 mm (8) méretűek és sárga, világosbarna színűek. Ettől a fázistól kezdve az atkákat nőstényekre és hímekre lehet osztani. Egy további vedlés után, mely idő alatt az állatok inaktívak és kifejlődik a barna pajzs (kb. 14 nap után), az atkák felnőttek (28) (29) (30). Az élettartamuk 48 és 100 nap között van 25 °C-on (27).

▼**M6**

8. függelék

A hypoaspis-vizsgálat végrehajtása érdekében megteendő főbb intézkedések összegzése és ütemezése

Idő (nap) vizsgálat kezdete = 0. nap	Tevékenység / feladat
-35. naptól -28. napig	Helyezzük át a nőstényeket a törzstenyészetből tiszta edényekbe a szinkronizálás megkezdéséhez 2 nappal később: a nőstények eltávolítása hetente kétszer vagy háromszor: elegendő táplálék biztosítása
-5. nap (+/- 2)	Készítsünk mesterséges talajt
-4. nap (+/- 2)	Határozzuk meg a mesterséges talaj WHC-értékét Szárítsuk egy éjszakán át Következő nap: mérjük meg a minták tömegét és számítsuk ki a WHC-értéket
-4. nap (+/- 2)	Nedvesítsük elő a mesterséges talajt, hogy annak nedvességtartalma a WHC 20–30 %-a legyen
0. nap	Kezdjük el a vizsgálatot: adjuk hozzá a vizsgált vegyi anyagot a mesterséges talajhoz Helyezzünk 10 nőstényt minden ismétlésbe Mérjük meg minden ismétlés tömegét Állítsunk fel abiotikus kontrollokat a nedvességtartalom és a pH méréséhez, 2 ismétlést minden kezelés esetében Szárítsuk a nedvességkontrollokat egy éjszakán át Következő nap: mérjük meg a nedvességkontrollok tömegét Következő nap: mérjük meg a szárított abiotikus kontrollok pH-ját
3., 6., 9., 12. nap (kb.)	Adjunk minden ismétléshez megfelelő mennyiségű prédaállatot Mérjük meg az ismétlések tömegét, és pótoljuk az elpárolgott vizet
14. nap	Fejezzük be a vizsgálatot, alakítsuk ki az extrakciós rendszert minden ismétlés esetében, valamint állítsuk fel az extrakció hatásfokát mérő kontrollokat Szárítsuk a víztartalomkontrollokat egy éjszakán át Következő nap: mérjük meg a víztartalomkontrollok tömegét Következő nap: mérjük meg a szárított kontrollok pH-ját
16. nap	Fejezzük be a kiemelést
16. nap után	Jegyezzük fel a felnőtt és a fiatal egyedek számát a kivont anyagokban Számoljunk be az eredményekről a sablontáblázatokban Számoljunk be a vizsgálati eljárásról a vizsgálati protokoll lapokon.

▼M6

C.37. 21 NAPOS HALVIZSGÁLAT: AZ ÖSZTROGÉN- ÉS ANDROGÉNHATÁS, VALAMINT AZ AROMATÁZGÁTLÁS RÖVID TÁVÚ SZŰRŐVIZSGÁLATA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 230. vizsgálati iránymutatásában (2009) leírt módszerrel. Az endokrin rendszerre ható egyes vegyi anyagok halfajokban történő kimutatására alkalmas vizsgálat kifejlesztése és validálása iránti igény azokból az aggodalmakból ered, hogy a vegyi anyagok a környezetben előforduló mennyiségükben az endokrin rendszerrel való kölcsönhatásuk révén káros hatással lehetnek az emberekre és az élővilágra egyaránt. 1998-ban az OECD a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint a hormonháztartást esetlegesen zavaró anyagok kiszűrését és vizsgálatát célzó új vizsgálati iránymutatások kidolgozására irányuló, kiemelt fontosságú tevékenységet indított. E tevékenység egyik eleme a halfajok endokrin rendszerére ható vegyi anyagok kiszűrésére vonatkozó vizsgálati iránymutatás kidolgozása volt. A halakkal végzett 21 napos endokrin szűrővizsgálatot a kiválasztott vegyi anyagokkal végzett, laboratóriumok közötti vizsgálatokból álló alapos validálási programnak vetették alá, hogy bizonyítsák a vizsgálat alkalmasságát az ösztrogénhatású és aromatázgátló vegyi anyagok megbízható kimutatására (1, 2, 3, 4, 5) a három vizsgált halfajban (amerikai cselle, japán fogasponty és zebradánió); az androgénhatás az amerikai csellében és a fogaspontyban kimutatható, de a zebradánióban nem. A vizsgálati módszer nem teszi lehetővé az antiandrogén hatású vegyi anyagok kimutatását. A validációs munka szakértői értékelését a vizsgálati iránymutatási program nemzeti koordinátorai által kinevezett szakértői testület végezte (6). A vizsgálat célja nem a hormonális zavarok specifikus mechanizmusainak meghatározása, mivel a vizsgálati állatok ép hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) tengellyel rendelkeznek, amely olyan vegyi anyagokra is reagálhat, amelyek eltérő szinteken gyakorolnak hatást a HPG-tengelyre. A halakon végzett rövid távú reprodukciós vizsgálat (OECD 229. vizsgálati iránymutatás) kiterjed az amerikai cselle fekunditásának vizsgálatára és – adott esetben – gonadális kórszövettani vizsgálatára, valamint az ebben a vizsgálati módszerben szereplő összes végpontra is. Az OECD 229. vizsgálati iránymutatása egy szűrővizsgálatot mutat be a szaporodást különböző (beleértve az endokrin rendszerre ható) mechanizmusokon keresztül befolyásoló vegyi anyagok kimutatására, amelyet a legmegfelelőbb vizsgálati módszer kiválasztása során figyelembe kell venni.

2. Az e fejezetben ismertetett vizsgálati módszer egy *in vivo* szűrővizsgálati eljárást ír le, amelynek során ivarérett hím és szaporodóképes nőstény halakat tartunk együtt és teszünk ki egy vegyi anyag hatásának életciklusuk egy korlátozott szakaszában (21 napig). A 21 napos expozíciós idő befejezésekor – az alkalmazott fajtól függően – egy vagy két biomarker végpontot mérünk a hímeknél és a nőstényeknél a vizsgált vegyi anyag ösztrogén-, aromatázgátló vagy androgénhatásának mutatójaként; ezek a végpontok a vitellogenin és a másodlagos nemi jellegek. A vitellogenint az amerikai csellénél, a japán fogaspontynál és a zebradániónál mérjük, míg a másodlagos nemi jelleget csak az amerikai csellénél és a japán fogaspontynál.

3. E biológiai vizsgálat *in vivo* szűrővizsgálatként szolgál bizonyos endokrin hatásmechanizmusok tekintetében és alkalmazását az „OECD fogalmi keret a hormonháztartást zavaró anyagok vizsgálatához és értékeléséhez” című dokumentummal összefüggésben kell értelmezni (28).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

4. A vitellogenin általában a nőstény ikrarakó gerincesek májában termelődik a keringő endogén ösztrogénekre adott válaszként. Az ikra sárgájában található fehérjék prekurzora, és a májban történő megtermelődése után a vérárammal jut el a petefészekbe, ahol a fejlődő ikrák felveszik és módosítják. A vitellogenin szinte kimutathatatlan a fiatal nőstény és hím halak vérplazmájában, mivel a szervezetükben nincs elegendő keringő ösztrogén; ugyanakkor a máj az exogén ösztrogénstimulációra adott válaszul is képes vitellogenin szintetizálására és kiválasztására.

▼M6

5. A vitellogenin mérésével kimutathatók a különböző ösztrogén hatásmechanizmusú vegyi anyagok. Az ösztrogenikus vegyi anyagok kimutathatók a hím halakban végbemenő vitellogeninindukció mérésével, amely módszerre számos hivatkozást találunk a lektorált tudományos szakirodalomban (pl. (7)). A vitelloginen indukcióját aromatizálható androgénekkel szembeni expozíció után is kimutatták (8, 9). A keringő ösztrogén szintjének csökkenése a nőstényeknél – például az endogén androgént természetes ösztrogén 17β-ösztradiollá konvertáló aromatáz gátlása miatt – a vitellogeninszint csökkenését okozza, amelyet az aromatázgátló tulajdonságokkal rendelkező vegyi anyagok kimutatására lehet használni (10, 11). Az ösztrogén/aromatázgátlást követően létrejövő vitellogenin-válasz biológiai jelentőségét megállapították és széles körben dokumentálták. Lehetséges azonban, hogy a VTG-termelést a nőstényeknél az általános toxicitás és a nem az endokrin rendszerre ható toxikus hatásmechanizmusok, pl. a hepatotoxicitás is befolyásolják.

6. Több rutin mérési módszert fejlesztettek már ki és szabványosítottak. Ilyenek a fajspecifikus enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálati módszerek (ELISA), amelyek immunkémiai eljárásokat használnak a termelt vitellogeninmennyiség meghatározására az egyes halakból gyűjtött kis vér- vagy májmintákban (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). A VTG mérése céljából az amerikai cselléből vér-, a zebradánióból vér- vagy fej/farok homogenizátumot, a fogaspontyból pedig májmintát kell venni. A fogasponty esetében jó korreláció áll fenn a vérben és a májban mért VTG-értékek között (19). A vitellogeninanalízishez előírt mintavételi eljárásokat a 6. függelék tartalmazza. A vitellogenin mérésére szolgáló készletek széles körben elérhetők; az ilyen készleteknek validált fajspecifikus ELISA-módszeren kell alapulniuk.

7. Egyes halfajok hím egyedeinek másodlagos nemi jellegei kívülről láthatók, számszerűsíthetők és reagálnak az endogén androgének szervezetben keringő mennyiségeire; ez a helyzet az amerikai cselle és a fogasponty esetében, de a zebradánió esetében nem, mert ez a faj nem rendelkezik számszerűsíthető másodlagos nemi jellemzőkkel. A nőstények képesek arra, hogy hím másodlagos nemi jellegeket fejlesszenek ki, ha vízben oldott androgén hatású vegyi anyagoknak vannak kitéve. A tudományos irodalomban számos vizsgálat áll rendelkezésre, amely dokumentálja az ilyen típusú választ az amerikai cselle (20) és a fogasponty (21) esetében. A másodlagos nemi jellegek csökkenését a hím egyedekben óvatosan kell értelmezni az alacsony statisztikai erő miatt, és az értelmezést szakértői megítélésre és a bizonyítékok súlyára kell alapozni. A vizsgálatban a zebradánió használatának – az androgénhatású vegyi anyagokra reagáló számszerűsíthető másodlagos nemi jellemzők hiánya miatt – vannak bizonyos korlátai.

8. Az amerikai csellében az exogén androgén expozíció fő mutatója a nőstény hal ormányán található nuptiális tuberculumok száma. A fogasponty nőstény egyedeiben a papillaris nyúlványok száma képezi az androgén vegyi anyagoknak való exogén kitettség fő markerét. Az amerikai cselle és a fogasponty nemi jellegének értékelése során követendő eljárásokat 5A. és 5B. függelék tartalmazza.

9. Az e vizsgálati módszerben használt fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

A VIZSGÁLAT ELVE

10. A vizsgálat során a vizsgálati edényekben vegyesen elhelyezett, párzóképes állapotú hím és nőstény halakat tesszük ki egy vegyi anyagnak. A felnőtt korú és párzóképes állapotú halakon a nemek egyértelműen megkülönböztethetők és ezáltal az egyes végpontok ivaronként elemezhetők, illetve biztosított a halak érzékenysége az exogén vegyi anyagok iránt. A vizsgálat befejezésekor a halak ivarát az ivarmirigyek makroszkopikus vizsgálatával

▼M6

támasztjuk alá a has ollóval történő ventrális felnyitása után. A biológiai vizsgálat lényeges feltételeiről a 2. függelék nyújt áttekintést. A vizsgálatot általában ívási állapotban lévő populációból vett halakkal indítjuk el; öregedő állatokat nem szabad használni. A halak életkorára és párzóképességére vonatkozó útmutató „A halak kiválasztása” című szakaszban található. A vizsgálatot a vegyi anyag három expozíciós koncentrációjával, valamint egy vizes kontrollal és szükség esetén egy oldószeres kontrollal végezzük. A zebradánió és a fogasponty esetében kezelésenként két edényt vagy ismétlést (minden edény 5 hímet és 5 nőstényt tartalmaz), míg az amerikai cselle esetében kezelésenként négy edényt vagy ismétlést használunk (minden edény 2 hímet és 4 nőstényt tartalmaz). Ez azért szükséges, hogy érvényesülhessen a hím amerikai csellék territoriális viselkedése, úgy, hogy a vizsgálathoz szükséges statisztikai erő is biztosított legyen. Az expozíciót 21 napig folytatjuk és a halakból az expozíció 21. napján veszünk mintát.

11. A 21. napon végzett mintavétel keretében az állatokat kíméletesen leöljük. Az amerikai cselle és a fogasponty esetében a másodlagos nemi jelleget mérjük (lásd az 5A. és 5B. függeléket); a zebradánióból és az amerikai csellébőlvérmintát gyűjtünk a vitellogenin meghatározására, míg a zebradánió esetében a vitellogenin meghatározására alternatívaként fej/farok mintát is lehet gyűjteni (6. függelék); a fogaspontyból májmintát gyűjtünk VTG-analízis céljára (6. függelék).

A VIZSGÁLAT ELFOGADHATÓSÁGI KRITÉRIUMAI

12. A következő feltételeknek kell teljesülniük ahhoz, hogy a vizsgálat elfogadható legyen:

— a mortalitási arány a vizes (vagy oldószeres) kontrollokban az expozíciós idő végén nem haladhatja meg a 10 %-ot,

— az expozíciós idő alatt az oldott oxigén koncentrációjának mindvégig legalább a levegőtelítettségi érték (ASV) 60 %-ának kell lennie,

— a víz hőmérsékletében soha nem lehet ±1,5 °C-nál nagyobb eltérés az egyes vizsgálati edények között, és a hőmérséklet a vizsgált fajra nézve meghatározott hőmérsékleti tartományon belül 2 °C-ot ingadozhat (2. függelék),

— bizonyítékkal kell alátámasztani, hogy a vizsgált vegyi anyag oldatban lévő koncentrációit az átlagos mért értékek ±20 %-os tartományán belül sikerült tartani.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

13. Normál laboratóriumi felszerelés és különösen az alábbiak:

a) oxigéntartalom- és pH-mérők;

b) a víz keménységi fokának és lúgosságának mérésére szolgáló berendezések;

c) a hőmérséklet szabályozására és lehetőleg folyamatos figyelemmel kísérésére is alkalmas készülékek;

d) kémiailag semleges anyagból készült és az ajánlott betelepítési aránynak és egyedsűrűségnek megfelelő kapacitású tartályok (lásd a 2. függeléket);

e) ívási aljzat az amerikai cselle és a zebradánió esetében; a szükséges adatok a 4. függelékben találhatók;

f) megfelelő pontosságú mérleg (azaz ±0,5 mg pontosságú).

▼M6

Víz

14. A vizsgálat céljára bármilyen víz felhasználható, amelyben a vizsgált fajok kellően hosszú ideig túlélnek a vizsgálati körülmények mellett, és növekednek. A víz minőségét a vizsgálat során mindvégig azonos szinten kell tartani. A víz pH-értékének a 6,5–8,5 tartományon belül kell lennie, azonban egy adott vizsgálat során a pH-érték csak ±0,5-del térhet el a kiindulási értéktől. Annak biztosítása céljából, hogy a hígítóvíz ne gyakoroljon nem kívánt hatást a vizsgálat eredményeire (pl. mert komplexet képez a vizsgált vegyi anyaggal), bizonyos időközönként vízmintákat kell venni és elemezni. A vízmintában a következőket kell mérni: a nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd és Ni), a fontosabb anionok és kationok (pl. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} és $SO4^{2-}$), a növényvédő szerek (pl. összes szerves foszfort és összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer), az összes szerves szén és a szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja, például háromhavonta, amennyiben a hígítóvízről ismert, hogy viszonylag állandó minőségű. Amennyiben a víz minősége legalább egy éven keresztül bizonyítottan változatlan, akkor ritkábban, nagyobb időközökkel is lehet ellenőrző méréseket végezni (pl. hathavonta egyszer). Az elfogadható minőségű hígítóvíz néhány kémiai tulajdonságának felsorolása a 3. függelékben található.

Vizsgálati oldatok

15. A kiválasztott koncentrációjú vizsgálati oldatok a törzsoldat hígításával készíthetők el. A törzsoldatot lehetőleg a vizsgált vegyi anyagnak a hígítóvízbe, mechanikai eszközök (pl. keverő, ultrahang) segítségével történő bekeverésével vagy hozzákeverésével kell elkészíteni. Telítési oszlopok (oldhatósági oszlopok) is használhatók a megfelelő koncentrációjú törzsoldat elkészítéséhez. Oldószer-hordozóanyag használata nem ajánlott. Abban az esetben azonban, ha oldószerre van szükség, párhuzamosan egy oldószeres kontrollt is futtatni kell a vegyi anyaggal történő kezelésekben alkalmazottal megegyező oldószer-koncentrációval. Nehezen vizsgálható vegyi anyagok esetében technikailag az oldószer lehet a legjobb megoldás; e tekintetben „A nehezen vizsgálható anyagok és keverékek vízi toxikológiai vizsgálata” című OECD-iránymutatást (22) kell tanulmányozni. A megfelelő oldószert a vegyi anyag tulajdonságai határozzák meg. Az OECD-iránymutatás maximum 100 µl/l értéket javasol, amelyet be kell tartani. Egy közelmúltban végzett felülvizsgálat (23) azonban további aggályokra hívta fel a figyelmet az oldószerek endokrin rendszerre kifejtett hatások vizsgálatában való használatával kapcsolatban. Ezért ajánlott, hogy amennyiben feltétlenül szükség van rá, az oldószer koncentrációja a lehető legkisebb legyen, ha ez technikailag megvalósítható (a vizsgált vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól függ).

16. Átfolyásos vizsgálati rendszert kell használni. Ez a rendszer a koncentrációsorozatnak a vizsgálati kamrákba történő bejuttatása céljából folyamatosan adagolja és hígítja a vizsgált vegyi anyag törzsoldatát (pl. adagolószivattyú, proporcionális hígító vagy telítőrendszer segítségével). A vizsgálat során időnként – lehetőleg naponta – ellenőrizni kell a törzsoldatok és a hígítóvíz áramlási sebességét, amelynek értéke a vizsgálat során nem változhat 10 %-nál nagyobb mértékben. Ügyelni kell arra, hogy ne használjunk rossz minőségű műanyag csöveket vagy egyéb olyan anyagokat, amelyek biológiailag aktív vegyi anyagokat tartalmazhatnak. Az állandó áramlású rendszerhez használt anyagok kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált anyagnak a kiválasztott anyaghoz való lehetséges adszorpcióját is.

A halak tartása

17. A vizsgálati halakat a laboratóriumi populációból kell kiválasztani, lehetőleg egyetlen tenyészetből, és a halakat a vizsgálat megkezdése előtt legalább két hétig a vizsgálat során alkalmazandó körülmények, vízminőség és megvilágítás mellett kell akklimatizálni. Fontos, hogy a betelepítési arány és egyedsűrűség (a fogalmak meghatározását lásd az 1. függelékben) a felhasznált vizsgálati fajnak megfelelő legyen (lásd a 2. függeléket).

18. A 48 órás betelepítési időszak után a mortalitást jegyzőkönyvezni kell, és az alábbi követelményeket kell alkalmazni:

▼M6

— amennyiben hét nap alatt a mortalitás a populáció 10 %-ánál nagyobb: az egész halállományt ki kell cserélni;

— amennyiben a mortalitás a populáció 5–10 %-a: további hét nap akklimatizációs időszakot kell beiktatni, és amennyiben a mortalitási arány ezt követően is magasabb 5 %-nál, az egész állományt ki kell cserélni;

— ha hét nap után a mortalitás 5 % alatt marad, az állomány elfogadható.

19. Az akklimatizációs időszak során, az expozíciót előkészítő időszakban és az expozíciós idő alatt a halak nem kaphatnak semmilyen betegség elleni kezelést.

Az expozíciót előkészítő időszak és a halak kiválasztása

20. Egyhetes expozíciót előkészítő időszak javasolt, amelynek során az állatokat a tényleges vizsgálatban alkalmazotthoz hasonló edényekben kell elhelyezni. A halakat a tartási időszak és az expozíciós fázis alatt *ad libitum* kell etetni. Az expozíciós fázist olyan, az ivarérett kifejlett állatok laboratóriumi készletéből származó, ivari kétalakúságot mutató, kifejlett (pl. az amerikai cselle és a fogasponty esetében jól látható másodlagos nemi jellegekkel rendelkező) halakkal kezdjük meg, amelyek aktívan ívnak. Általános iránymutatásként (és ezt a szempontot nem szabad az adott halállomány tényleges párzóképességétől elszigetelten szemlélni) az amerikai csellék kb. 20 (± 2) hetesek legyenek, feltételezve, hogy egész életük során 25 ± 2 °C-on tartottuk őket. A japán fogaspontyok körülbelül 16 (± 2) hetesek legyenek, feltételezve, hogy egész életük során 25 ± 2 °C-on tartottuk őket. A zebradániók körülbelül 16 (± 2) hetesek legyenek, feltételezve, hogy egész életük során 26 ± 2 °C-on tartottuk őket.

VIZSGÁLATI TERV

21. A vizsgált vegyi anyag három koncentrációját, egy (vizes) kontrollt, illetve – szükség esetén – egy oldószeres kontrollt használunk. Az adatokat a kezelések és a kontrollok esetében kapott válaszok közötti statisztikailag szignifikáns különbség meghatározása érdekében elemezhetjük. Ezek az elemzések nem a kockázatelemzésben hasznosak (24), sokkal inkább arról adnak tájékoztatást, hogy szükség van-e a vegyi anyag káros hatásainak további hosszabb távú vizsgálatára (vagyis a túlélés, a fejlődés, a növekedés és a szaporodás vizsgálatára).

22. A zebradánió és a fogasponty esetében a vizsgálat 21. napján hím és nőstény állatokat mintavételezünk minden kezelési szintből (5 hím és 5 nőstény mindkét ismétlésben), valamint a kontrollcsoport(ok)ból is a vitellogenin és – adott esetben – a másodlagos nemi jellegek mérésére. Az amerikai cselle esetében az expozíció 21. napján hím és nőstény állatokat mintavételezünk (2 hím és 4 nőstény mind a négy ismétlésben), valamint a kontrollcsoport(ok)ból is a vitellogenin és másodlagos nemi jellegek mérésére.

A vizsgálati koncentrációk kiválasztása

23. E vizsgálat esetében a legnagyobb vizsgálati koncentrációt a legnagyobb elviselhető koncentráció (maximum tolerated concentration, MTC) alapján kell meghatározni, amelyet dózisbehatároló vizsgálattal vagy egyéb toxicitási adatokból, illetve 10 mg/l-ben, vagy a maximális vízoldhatóság mértékében kell megállapítani (amelyik a legalacsonyabb). Az MTC a vegyi anyag azon legnagyobb vizsgálati koncentrációja, amely kevesebb, mint 10 %-os mortalitást eredményez. E megközelítés azt feltételezi, hogy rendelkezésre állnak azok az empirikus akut toxicitási vagy egyéb toxicitási adatok, amelyekből az MTC-t meg lehet becsülni. Az MTC becslése pontatlan lehet és alkalmazhatóságáról jellemzően egyéni szakmai megítélés alapján kell dönteni.

▼M6

24. Három vizsgálati koncentrációra van szükség, amelyek állandó osztásköze nem haladja meg a 10-et, valamint egy hígítóvizes kontrollra (és szükség esetén egy oldószeres kontrollra is). 3,2 és 10 közötti osztásköz ajánlott.

ELJÁRÁS

A vizsgálati halak kiválasztása és lemérése

25. Fontos a halak testtömegeltéréseinek minimumra csökkentése a vizsgálat elején. A vizsgálathoz javasolt különböző halfajok megfelelő mérettartományait az 2. függelék tartalmazza. A vizsgálatban alkalmazott egész halállomány tekintetében a hím és nőstény halak vizsgálat elején mért egyéni testtömegének lehetőleg az azonos nemű halak testtömege számtani átlagának ± 20 %-os tartományában kell lennie. Az átlagos testtömeg előzetes becslése céljából javasolt a vizsgálat előtt a halállomány egy részmintájának a tömegét lemérni.

Expozíciós körülmények

Időtartam

26. A vizsgálat időtartama 21 nap, egy expozíciót előkészítő időszakot követően. Az expozíciót előkészítő időszak ajánlott ideje egy hét.

Táplálás

27. A halakat *ad libitum* kell etetni a megfelelő táplálékkal (2. függelék) olyan mennyiségben, amely segít fenntartani fizikai állapotukat. Gondosan kerülni kell a mikrobatenyészetek kialakulását és a víz zavarossá válását. Általános iránymutatásként a napi adagot két vagy három egyenlő részre lehet osztani, és a halakat naponta többször etetni, az egyes etetések között legalább három órát hagyva. Az egyszerre adott nagyobb adag is elfogadható, különösen hétvégén. A halak a mintavételezés/boncolás előtti 12 órában nem kaphatnak táplálékot.

28. A haleledelben vizsgálni kell a szennyező anyagok – szerves klórt tartalmazó növényvédő szerek, policiklikus aromás szénhidrogének (PAH) és poliklórozott bifenilek (PCB-k) – előfordulását. Kerülni kell a magas fitoösztrogén-tartalmú táplálékokat, amelyek a vizsgálatban befolyásolnák az ismert ösztrogénagonistákra (pl. a 17-béta-ösztradiolra) adott választ.

29. Az el nem fogyasztott táplálékot és az ürüléket legalább hetente kétszer el kell távolítani az edényekből, pl. a tartályok alját szifonnal megtisztítva.

Fény és hőmérséklet

30. A megvilágítási időszakokat és a víz hőmérsékletét a vizsgált halfajok sajátosságaihoz kell igazítani (lásd a 2. függeléket).

Az analitikai vizsgálatok és mérések gyakorisága

31. Az expozíciós időszak megkezdése előtt gondoskodni kell a vegyi anyagot befogadó rendszere megfelelő működéséről. Meg kell állapítani a szükséges analitikai módszereket, illetve a vegyi anyag vizsgálati rendszerben való kémiai stabilitásáról megfelelő ismereteket kell szerezni. A vizsgálat alatt a vizsgált vegyi anyag koncentrációit rendszeres időközönként határozzuk meg az alábbiak szerint: a hígító és a toxikus törzsoldat áramlási sebességét lehetőleg naponta kell ellenőrizni, de minimum hetente kétszer, és értéke a vizsgálat során nem változhat 10 %-nál nagyobb mértékben. A vizsgált vegyi anyag tényleges koncentrációit ajánlott minden edényben a vizsgálat elején és azt követően hetente egyszer megmérni.

32. Az eredményeket célszerű a ténylegesen mért koncentrációértékekre alapozni. Amennyiben azonban az oldatban lévő vizsgált vegyi anyag koncentrációját sikerült a vizsgálatok során mindvégig a névleges koncentráció ± 20 %-os tartományán belül tartani, akkor az eredményeket a névleges vagy a mért értékekre is lehet alapozni.

33. Szükség lehet a minták szűrésére (0,45 μm pórusméretű szűrőbetét használatával) vagy centrifugálására. Ha erre van szükség, akkor a centrifugálás az ajánlott eljárás. Amennyiben azonban a vizsgált anyag nem adszorbeálódik a szűrő felszínén, akkor a szűrés is elfogadható módszer.

▼M6

34. A vizsgálat alatt minden vizsgálati edényben legalább hetente egyszer meg kell mérni az oldott oxigén koncentrációját, a hőmérsékletet és a pH-t. Az víz összes keménységét és a lúgosságát legalább hetente egyszer meg kell mérni a kontrollokban és a legmagasabb vizsgálati koncentrációt tartalmazó egyik edényben. A hőmérsékletet legalább egy vizsgálati edényben folyamatosan figyelemmel kell kísérni.

Megfigyelések

35. Több általános (pl. túlélés arány) és alapvető biológiai választ (pl. vitellogeninszintek) értékelünk a vizsgálat során vagy a vizsgálat befejezésekor. E végpontok mérését és értékelését, illetve hasznosságát az alábbiakban ismertetjük.

Túlélési arány

36. A halakat a vizsgálati időszak alatt naponta meg kell vizsgálni, a mortalitást fel kell jegyezni, és az elpusztult halakat a lehető leghamarabb el kell távolítani. Az elpusztult halakat nem szabad sem a kontroll-, sem a kezelési edényekben újakra cserélni. A vizsgálat során elpusztult halak ivarát meg kell határozni az ivarmirigyek makroszkopikus vizsgálatával.

Viselkedés és külső megjelenés

37. A rendellenes viselkedést (a kontrollhoz képest) fel kell jegyezni; ide sorolhatók az általános toxicitás jelei, beleértve a hiperventilációt, a koordinálatlan úszást, az egyensúly elvesztését és az atipikus nyugalmat vagy táplálkozást. Emellett a külső rendellenességeket (bevérzés, elszíneződés) is fel kell jegyezni. A toxicitás ilyen jeleit az adatok értelmezése során gondosan mérlegelni kell, mert olyan koncentrációkat jelezhetnek, amelyek mellett a hormonhatás biomarkerei nem megbízhatóak. A viselkedésre vonatkozó ilyen jellegű megfigyelések hasznos kvalitatív információkkal szolgálhatnak a potenciális jövőbeni halvizsgálati követelmények tekintetében is. Az amerikai cselle esetében például androgénexpozíció hatására területi agresszivitást figyeltek meg a hímekben vagy a maszkulinizált nőstényekben; a zebradániónál az ösztrogén- és antiandrogén-expozíció csökkenti vagy akadályozza a fajnál jellegzetesen az első hajnali fénnyel jelentkező párzási és ívási magatartást.

38. Mivel a külső megjelenés néhány aspektusa (elsősorban a szín) az állatok kezelésének hatására gyorsan változhat, fontos, hogy a kvalitatív megfigyeléseket az állatoknak a vizsgálati rendszerből való eltávolítása előtt végezzük el. Az amerikai csellével szerzett eddigi tapasztalatok arra utalnak, hogy egyes endokrin rendszerre ható vegyi anyagok először a következő külső jellemzőkben idéznek elő változásokat: testszín (világos vagy sötét), mintázat (függőleges sávok jelenléte), valamint a test alakja (a fej és a pektorális régió). Ezért a halak fizikai megjelenésével kapcsolatos megfigyeléseket kell tenni a vizsgált során és a vizsgálat végén.

A halak humánus leölése

39. A 21. napon – azaz az expozíció befejezésekor – a halakon a nyálkahártya-irritáció csökkentése érdekében 300 mg/l $NaHCO_3$ (nátrium-hidrogénkarbonát, CAS 144-55-8) oldattal pufferolt megfelelő mennyiségű trikainnal (trikain-metán-szulfonát, Metacain, MS-222 (CAS 886-86-2), 100–500 mg/l) eutanáziát kell végezni; ezután a „Vitellogenin” című szakaszban leírtak szerint vér- vagy szövetmintát veszünk a vitellogenin szintjének meghatározásához.

▼M6

A másodlagos nemi jellegek megfigyelése

40. Egyes endokrin rendszerre ható vegyi anyagok változásokat idéznek elő a speciális másodlagos nemi jellegekben (a nuptiális tuberkulumok száma a hím amerikai csellében, a papilláris nyúlványok száma a hím fogaspontyban). Bizonyos hatásmechanizmusú vegyi anyagok az ellenkező nemű állatokra jellemző másodlagos nemi jelleg kóros előfordulását idézhetik elő; a trenbolonhoz, a metiltesztoszteronhoz és a dihidrotesztoszteronhoz hasonló androgénreceptor-agonisták például a nőstény amerikai csellénél jól fejlett nuptiális tuberkulumok, nőstény fogaspontyoknál pedig papilláris nyúlványok megjelenését okozhatják (11, 20, 21). Azt is feljegyezték, hogy felnőtt hímekben az ösztrogénreceptor-agonisták csökkenthetik a nuptiális tuberkulumok számát és a dorzális tarkólemez méretét (25, 26). Az ilyen általános morfológiára vonatkozó megfigyelések hasznos kvalitatív és kvantitatív információt nyújthatnak a potenciális jövőbeni halvizsgálati követelmények tekintetében. Az amerikai csellénél a nuptiális tuberkulumok, illetve fogaspontynál a papilláris nyúlványok számát és méretét közvetlenül, vagy egyszerűbben konzervált példányokon lehet számszerűsíteni. Az amerikai cselle és a fogasponty másodlagos nemi jellemzőinek értékelésére ajánlott eljárások az 5A., illetve az 5B. függelékben találhatók.

Vitellogenin (VTG)

41. A vérmintákat a kaudális artériából/vénából heparinnal kezelt mikrohematokrit kapilláriscsővel, vagy pedig fecskendővel végzett szívpunkcióval gyűjtjük. A hal méretétől függően a begyűjthető vértérfogat példányonként általában 5–60 µl az amerikai cselle és 5–15 µl a zebradánió esetében. A plazmát a vérből centrifugálással különítjük el, és a vitellogeninszint vizsgálatáig proteázinhibitorokat hozzáadva – 80 °C-on tároljuk. Alternatív megoldásként a fogasponty esetében a májból, zebradánió esetében pedig a fej/farok homogenizátumból vett szövetmintát is használhatunk a vitellogeninszint meghatározásához (6. függelék). A VTG mérésének homológ VTG standardokat és homológ antitesteket használó validált homológ ELISA módszeren kell alapulnia. Olyan módszer alkalmazása javasolt, amely a VTG-t alacsony, akár néhány ng/ml vérplazma (vagy ng/mg szövet) koncentrációban is képes kimutatni, ami a vizsgált vegyi anyagnak nem kitett hím halakban megfigyelhető háttérszintnek felel meg.

42. A vitellogeninanalízis minőségellenőrzését standardok és vakpróbák alkalmazásával, illetve legalább két ismétlésben végzett analízis révén biztosítjuk. A minimális mintahígítási tényező meghatározása céljából minden ELISA módszer esetében le kell futtatni egy tesztet a mátrixhatás (a mintahígítás hatásának) vizsgálatára. A VTG vizsgálati eljárásokban felhasznált minden ELISA-lemeznek a következő minőségellenőrzési mintákat kell tartalmaznia: a várható vitellogeninkoncentrációkat lefedő legalább 6 kalibrációs standard, és legalább egy nem specifikus kötési vakpróba (két példányban analizálva). E vakpróbák abszorbanciája a kalibrációs standard maximális abszorbanciájának legfeljebb 5 %-a lehet. Az egyes hígítási minták legalább két alikvotjának (párhuzamos lyukak) analízisét végezzük el. Azokat a párhuzamos lyukakat, amelyek értékei között az eltérés nagyobb, mint 20 %, újra kell analizálni.

43. A kalibrációs görbék korrelációs együtthatója (R^2) 0,99-nál nagyobb legyen. Ugyanakkor azonban a magas korreláció nem garantálja a koncentráció megfelelő előrejelzését minden tartományban. A kalibrációs görbe elegendően nagy korrelációja mellett az egyes standardok kalibrációs görbe alapján számolt koncentrációjának a névleges koncentráció 70–120 %-a közé kell esnie. Ha a névleges koncentráció távolodik a kalibrációs regressziós egyenestől (pl. az alacsonyabb koncentrációknál), szükség lehet arra,

▼M6

hogy a kalibrációs görbét alacsony és magas tartományra osszuk, vagy hogy egy nemlineáris modellt alkalmazzunk az abszorbanciaadatok megfelelő illesztésére. Ha a görbét kettéosztjuk, mindkét vonalszakasznak $R^2 > 0,99$ értékkel kell rendelkeznie.

44. A kimutatási határérték (LOD) a legalacsonyabb analitikai standard koncentrációja, a mérhetőségi határérték (LOQ) pedig a legalacsonyabb analitikai standard koncentrációjának és a legkisebb hígítási tényezőnek a szorzata.

45. Minden olyan napon, amikor vitellogeninvizsgálatot végzünk, egy inter-assay (vizsgálatközi) referenciastandard felhasználásával készült dúsított mintát is analizálunk (7. függelék). Az adott napon végzett vizsgálatok eredményeivel együtt jegyzőkönyvezni kell a várt koncentrációnak a mért koncentrációhoz viszonyított arányát is.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

A biomarker-válaszok értékelése varianciaanalízissel (ANOVA)

46. Egy vegyi anyag endokrin rendszerre kifejtett potenciális hatásának azonosítása céljából varianciaanalízissel (ANOVA) összehasonlítjuk a kezelésenként és kontrollcsoportonként kapott válaszokat. Ha oldószeres kontrollt is alkalmazunk, minden végpont tekintetében megfelelő statisztikai próbát kell végezni a hígítóvízes és az oldószeres kontrollok összehasonlítására is. A hígítóvizes és az oldószeres kontrollok esetében kapott adatoknak a rákövetkező statisztikai elemzés során való felhasználására vonatkozó iránymutatás az OECD 2006c (27) szakirodalmi hivatkozásban található. Az összes biológiai válaszadatot elemezni és nemenként jegyzőkönyvezni kell. Amennyiben nem teljesülnek a paraméteres módszerekhez szükséges feltételek – nemnormális eloszlás (pl. Shapiro–Wilk-próba) vagy heterogén variancia (Bartlett- vagy Levene-féle próba) –, akkor fontolóra lehet venni az adatok transzformálását a variancia homogenizálása érdekében az ANOVA elemzés elvégzése előtt, vagy a súlyozott ANOVA elemzés alkalmazását. Nem monoton dózis-válasz esetén a többszörös páronkénti összehasonlításon végzett Dunnett-féle próba (parametrikus) vagy a Bonferroni-korrekcióval végzett Mann–Whitney-féle próba (nem paraméteres) is használható. Ha a dózis-hatás nagyjából monoton, egyéb statisztikai próbákat lehet alkalmazni (pl. Jonckheere–Terpstra próba vagy Williams-féle próba). A 8. függelékben található statisztikai folyamatábra segít a legmegfelelőbb statisztikai próbára vonatkozó döntés meghozatalában. További információ található az „Aktuális megközelítések az ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében” című OECD-dokumentumban (27).

A vizsgálati eredmények jegyzőkönyvezése

47. A vizsgálati adatoknak tartalmazniuk kell:

Vizsgálólétesítmény:

— Felelős személyek és vizsgálati feladataik

— Minden laboratóriumnak igazolnia kell jártasságát reprezentatív vegyi anyagok használatában

Vizsgált vegyi anyag:

— A vizsgált vegyi anyag jellemzése

— Fizikai jelleg és lényeges fizikai-kémiai tulajdonságok

▼**M6**

— A vizsgálati koncentrációk elkészítésének módja és gyakorisága

— A stabilitásra és a biológiai lebonthatóságra vonatkozó információk

Oldószer:

— Az oldószer jellemzése (jelleg, alkalmazott koncentráció)

— Az oldószer kiválasztásának indoklása (ha nem víz)

Vizsgálati állatok:

— Faj és törzs

— Szállító és a konkrét szállító létesítmény

— A halak életkora a vizsgálat elején, valamint a halak párzóképes/ívási állapota

— Az állatok akklimatizációjának részletei

— A halak testtömege az expozíció elején (a halállomány részmintájában)

Vizsgálati körülmények:

— Alkalmazott vizsgálati eljárás (vizsgálat típusa, betelepítési arány, betelepítési egyedsűrűség stb.);

— A törzsoldatok elkészítésének módszere és az áramlási sebesség;

— Névleges vizsgálati koncentrációk, a vizsgálati oldatok hetente mért koncentrációi és az analitikai módszer, a vizsgálati edényekben mért értékek átlaga és szórása, valamint bizonyíték arra, hogy a mérések a vizsgált vegyi anyag valódi oldatban lévő koncentrációira vonatkoznak;

— A hígítóvíz jellemzői (beleértve a pH-t, a keménységet, a lúgosságot, a hőmérsékletet, az oldott oxigén koncentrációját, a maradékklór-tartalmat, a teljes szerves széntartalmat, a szuszpendált szilárd anyagokat és bármely egyéb elvégzett mérés eredményét)

— Vízminőség a vizsgálati edényekben: pH-érték, keménység, hőmérséklet és az oldott oxigén koncentrációja;

— Az etetésre vonatkozó részletes információk (pl. a táplálék(ok) típusa, forrása, az adagolt mennyiség és az etetés gyakorisága, valamint a lényeges szennyezőanyagok elemzése (pl. PCB-k, PAH-ok, és szerves klórt tartalmazó növényvédő szerek), ha rendelkezésre állnak).

Eredmények

— Annak igazolása, hogy a kontrollok teljesítették a vizsgálat elfogadhatósági kritériumait;

— A vizsgálati koncentrációk és a kontrollok bármelyikében előforduló egyedpusztulásokra vonatkozó adatok;

— Statisztikai elemzési technikák, az adatok kezelése és az alkalmazott technikák indoklása;

— Az általános morfológiára vonatkozó biológiai megfigyelések adatai, beleértve a másodlagos nemi jellegeket és a vitellogenin szintjét;

▼M6

— Az adatelemzés eredményei lehetőleg táblázatos és grafikus formában;

— A halak szokatlan reakcióinak és a vizsgált vegyi anyag által előidézett bármely látható elváltozásnak az előfordulása.

ÚTMUTATÓ A VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSÉHEZ ÉS ELFOGADÁSÁHOZ

48. Ez a szakasz olyan szempontokat tartalmaz, amelyeket figyelembe kell venni a különböző mért végpontok vizsgálati eredményeinek értelmezése során. Az eredményeket körültekintően kell értelmezni, ha úgy tűnik, hogy a vizsgált vegyi anyag nyilvánvaló toxicitást okoz vagy befolyásolja a kísérleti állatok általános állapotát.

49. A vizsgálati koncentrációk tartományának kijelölése során ügyelni kell arra, hogy ne lépjük túl a legnagyobb elviselhető koncentrációt, mert csak így lesz lehetőség az adatok megfelelő értelmezésére. Fontos, hogy legalább egy olyan kezelés legyen, ahol nincs jele toxikus hatásoknak. A betegség és a toxikus hatások jeleit alaposan meg kell vizsgálni és jegyzőkönyvezni kell. Lehetséges például, hogy a nőstényeknél a VTG termelését az általános toxicitás és a nem az endokrin rendszerre ható toxikus hatásmechanizmusok, pl. a hepatotoxicitás is befolyásolják. A hatások helyes értelmezését azonban segíthetik azok az egyéb kezelési szintek, amelyeket nem zavar a szisztémás toxicitás.

50. Van néhány szempont, amelyet figyelembe kell venni a vizsgálati eredmények elfogadása során. Útmutatásként a hímek és a nőstények kontrollcsoportjaiban mért VTG-szinteknek különbözőnek és egymástól körülbelül három nagyságrenddel eltérőnek kell lenniük az amerikai cselle és a zebradánió esetében, illetve körülbelül egy nagyságrenddel eltérőnek a fogasponty esetében. A kontroll- és a kezelési csoportokban előforduló értéktartományokra a validálási jelentésekben találhatók példák (1, 2, 3, 4). A kontrollcsoport hímjeinél mért magas VTG-értékek veszélyeztethetik a vizsgálat válaszkészségét és a gyenge ösztrogénagonisták felismerésére való képességét. A kontrollnőstényekben mért alacsony VTG-értékek veszélyeztethetik a vizsgálat válaszkészségét, illetve az aromatázgátlók és az ösztrogénantagonisták felismerésére való képességét. Ez az útmutatás a validálási vizsgálatok alapján készült.

51. Ha a laboratórium korábban még nem végezte a vizsgálatot vagy jelentős változások történtek (pl. a haltörzsben vagy a szállítóban), célszerű lefolytatni egy technikai jártassági vizsgálatot. Olyan vegyi anyagokat javasolt használni, amelyek különböző hatásmechanizmussal rendelkeznek vagy több vizsgálati végpontra is hatással vannak. A gyakorlatban a laboratóriumokat arra ösztönzik, hogy építsenek fel saját adatbázist a hímekre és a nőstényekre vonatkozó korábbi kontrolladatokból úgy, hogy pozitív kontrollvizsgálatot végeznek egy ösztrogénhatású vegyi anyaggal (pl. 17β-ösztradiol 100 μg/l koncentrációban, vagy egy ismert gyenge agonista), amely megnöveli a VTG szintjét a hím halakban, továbbá pozitív kontrollvizsgálatot végeznek egy aromatázgátló vegyi anyaggal (pl. fadrozol vagy prokloraz 300 μg/l koncentrációban), amely csökkenti a VTG szintjét a nőstény halakban, és pozitív kontrollvizsgálatot végeznek egy androgénhatású vegyi anyaggal (pl. 17β-trenbolon 5 μg/l koncentrációban), amely a másodlagos nemi jellegek megjelenését eredményezi a nőstény amerikai csellében és a fogaspontyban. Ezeket az adatokat a laboratórium jártasságának igazolása céljából össze lehet hasonlítani a validációs vizsgálatokból (1, 2, 3) származó adatokkal.

52. A vitellogeninméréseket általában akkor kell pozitívnak tekinteni, ha – legalább a legmagasabb vizsgált dózisban – a VTG statisztikailag szignifikáns növekedése ($p < 0,05$) figyelhető meg a hímeknél vagy statisztikailag szignifikáns csökkenése ($p < 0,05$) figyelhető meg a nőstényeknél a kontrollcsoporttal összehasonlítva, általános toxicitásra utaló jelek nélkül. A pozitív eredményt még inkább alátámaszthatja a dózis és a hatásgörbe közötti biológiai szempontból hihető kapcsolat. Mint korábban említettük, a vitellogenin csökkenése nem feltétlenül teljesen endokrin eredetű; a pozitív eredményt azonban általában az *in vivo* endokrin hatás bizonyítékaként kell értelmezni, és rendszerint az eredmény tisztázása érdekében tett további intézkedések követik.

▼**M6**

SZAKIRODALOM

(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. 104 pp.

(6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.

(7) Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (Pimephales promelas). Toxicological Sciences;67(1):121-30.

(11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

▼**M6**

(13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (Danio rerio Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J, Holbech H, Lindholst C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 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 and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50:301-308.

(20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

(23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

(24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts", not „traffic lights", in risk assessment. Environmental Health Perspectives;114 Suppl 1:106-14.

(25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17B-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

▼**M6**

(26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18

(28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MONO(2012)22

▼M6

1. függelék

RÖVIDÍTÉSEK ÉS FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

CV: relatív szórás.

ELISA: enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay).

Betelepítési arány: a halak nedvesen mért tömege egységnyi mennyiségű vízben.

Betelepítési egyedsűrűség: a halak száma egységnyi mennyiségű vízben.

VTG (vitellogenin): az ikra sárgájában található foszfo-, lipo- és glikoproteinek prekurzora, amely alapesetben az ikrarakó fajok szexuálisan aktív nőstényeiben fordul elő.

HPG-tengely: hypothalamusz-hipofízis-gonád tengely.

MTC: legnagyobb elviselhető koncentráció, amely az LC_{50} körülbelül 10 %-a.

Vizsgált vegyi anyag: a jelen vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼M6

2. függelék

A halakban végzett endokrin szűrővizsgálat kísérleti körülményei

1. Ajánlott faj	**Amerikai cselle** (*Pimephales promelas*)	**Fogasponty** (*Oryzias latipes*)	**Zebradánió** (*Danio rerio*)
2. Vizsgálat típusa	Átfolyásos	Átfolyásos	Átfolyásos
3. Vízhőmérséklet	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Megvilágítás jellege	Fluoreszcens izzók (széles spektrum)	Fluoreszcens izzók (széles spektrum)	Fluoreszcens izzók (széles spektrum)
5. Fényerő	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 lux vagy 50–100 ft-c (környezeti laboratóriumi szintek)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 lux vagy 50–100 ft-c (környezeti laboratóriumi szintek)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 000 lux vagy 50–100 ft-c (környezeti laboratóriumi szintek)
6. Megvilágítási időszak (hajnali/alkonyati átmeneti időszakok is alkalmazhatók, de nem feltétlenül szükségesek)	16 óra fény, 8 óra sötét	12–16 óra fény, 12–8 óra sötét	12–16 óra fény, 12–8 óra sötét
7. Betelepítési arány	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Vizsgálati kamra mérete	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. Vizsgálati oldat térfogata	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. Vizsgálati oldatok térfogatának cseréje	Naponta legalább 6x	Naponta legalább 5x	Naponta legalább 5x
11. Vizsgálathoz használt organizmusok életkora	Lásd a 20. pontot.	Lásd a 20. pontot.	Lásd a 20. pontot.
12. Kifejlett halak hozzávetőleges nedves tömege (g)	Nőstények: 1,5 ± 20 % Hímek: 2,5 ± 20 %	Nőstények: 0,35 ± 20 % Hímek: 0,35 ± 20 %	Nőstények: 0,65 ± 20 % Hímek: 0,4 ± 20 %
13. Halak száma vizsgálati edényenként	6 (2 hím és 4 nőstény)	10 (5 hím és 5 nőstény)	10 (5 hím és 5 nőstény)
14. Kezelések száma	= 3 (plusz megfelelő kontrollok)	= 3 (plusz megfelelő kontrollok)	= 3 (plusz megfelelő kontrollok)
15. Edények száma kezelésenként	Minimum 4	Minimum 2	Minimum 2
16. Halak száma vizsgálati koncentrációnként	16 felnőtt nőstény és 8 hím (4 nőstény és 2 hím minden ismétlésben)	10 felnőtt nőstény és 10 hím (5 nőstény és 5 hím minden ismétlésben)	10 felnőtt nőstény és 10 hím (5 nőstény és 5 hím minden ismétlésben)
17. Etetési rend	Naponta két-három alkalommal (ad libitum) élő vagy fagyasztott felnőtt vagy sós nauplius rák, kereskedelmi forgalomban kapható eledel vagy ezek kombinációja	Naponta két-három alkalommal (ad libitum) sós nauplius rák, kereskedelmi forgalomban kapható eledel vagy ezek kombinációja	Naponta két-három alkalommal (ad libitum) sós nauplius rák, kereskedelmi forgalomban kapható eledel vagy ezek kombinációja

▼**M6**

18. Levegőztetés	Nincs, kivéve ha a DO-koncentráció a 60 %-os levegőtelítettség alá esik	Nincs, kivéve ha a DO-koncentráció a 60 %-os levegőtelítettség alá esik	Nincs, kivéve ha a DO-koncentráció a 60 %-os levegőtelítettség alá esik
19. Hígítóvíz	Tiszta felszíni víz, kútvíz, mesterséges víz vagy klórmentesített csapvíz	Tiszta felszíni víz, kútvíz, mesterséges víz vagy klórmentesített csapvíz	Tiszta felszíni víz, kútvíz, mesterséges víz vagy klórmentesített csapvíz
20. Expozíciót előkészítő időszak	7 nap ajánlott	7 nap ajánlott	7 nap ajánlott
21. Vizsgált vegyi anyaggal történő expozíció időtartama	21 nap	21 nap	21 nap
22. Biológiai végpontok	túlélési arány viselkedés másodlagos nemi jellegek VTG	túlélési arány viselkedés másodlagos nemi jellegek VTG	túlélési arány viselkedés VTG
23. A vizsgálat elfogadhatósága	Az oldott oxigén a telítettség > 60 %-a; az átlagos hőmérséklet 25 ± 2 °C; a halak 90 %-os túlélési aránya a kontrollokban; a mért vizsgálati koncentrációk a kezelési szintek átlagos mért értékeinek 20 %-os tartományán belül helyezkednek el.	Az oldott oxigén a telítettség > 60 %-a; az átlagos hőmérséklet 24 ± 2 °C; a halak 90 %-os túlélési aránya a kontrollokban; a mért vizsgálati koncentrációk a kezelési szintek átlagos mért értékeinek 20 %-os tartományán belül helyezkednek el.	Az oldott oxigén a telítettség > 60 %-a; az átlagos hőmérséklet 26 ± 2 °C; a halak 90 %-os túlélési aránya a kontrollokban; a mért vizsgálati koncentrációk a kezelési szintek átlagos mért értékeinek 20 %-os tartományán belül helyezkednek el.

▼**M6**

3. függelék

Az elfogadható minőségű hígítóvíz néhány fontosabb kémiai tulajdonsága

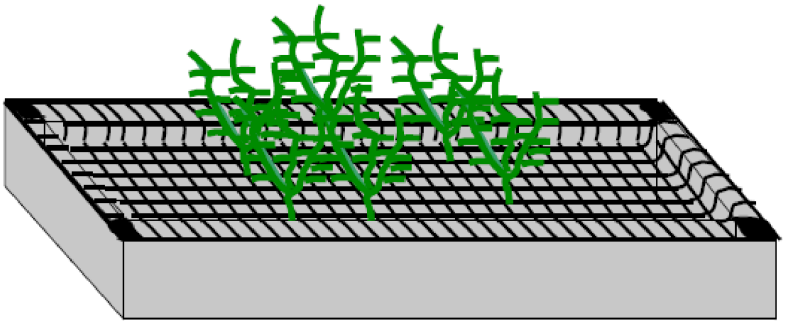
Összetevő	Koncentráció
Finomszemcsés anyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 mg/l
Ionizálatlan ammónia	< 1 μg/l
Maradék klór	< 10 μg/l
Összes szerves foszfort tartalmazó növényvédő szer	< 50 ng/l
Összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer plusz poliklórozott bifenilek	< 50 ng/l
Összes szerves klór	< 25 ng/l

▼**M6**

4A. függelék

Ívási aljzat a zebradánió részére

Ívási tálca: bármilyen, üvegből készült eszköztartó edény, például 22x15x5,5 cm méretű (hosszúság x szélesség x mélység), eltávolítható rozsdamentes acél ráccsal fedve (2 mm-es lyukbőség). A rácsnak a perem alatti magasságban kell fednie az eszköztartó edény nyílását.



A rácsra ívási aljzatot kell rögzíteni. A közegnek olyan szerkezetet kell biztosítania a halak részére, amelybe beköltözhetnek. A zöld műanyagból készült mesterséges akváriumnövények például alkalmasak erre a célra (megjegyzés: figyelembe kell venni a vizsgált vegyi anyagnak a műanyaghoz való lehetséges adszorpcióját). A műanyagot elegendő ideig megfelelő mennyiségű meleg vízben kell áztatni, hogy ne bocsásson ki vegyi anyagokat a vizsgálati vízbe. Ha üvegből készült anyagokat használunk, biztosítani kell, hogy a halak intenzív mozgásuk során ne sérüljenek meg vagy szoruljanak be.

A tálca és az üvegfalak közötti távolság legalább 3 cm legyen, hogy az ívás ne történhessen a tálcán kívül. A tálcára lerakott ikrák átesnek a rácson, és 45–60 perccel a megvilágítás kezdete után mintát lehet venni belőlük. Az átlátszó ikrák nem tapadnak, és keresztirányú fény segítségével könnyen meg lehet számolni őket. Ha öt nőstényt használunk edényenként, a legfeljebb 20 ikra/nap mennyiség alacsonynak, a legfeljebb 100 ikra/nap mennyiség közepesnek, a több mint 100 ikra/nap mennyiség pedig magasnak számít. Az ívási tálcát – a lehető legkésőbbi esti időpontban vagy kora reggel – el kell távolítani, az ikrákat össze kell gyűjteni, majd az ívási tálcát újra be kell helyezni a vizsgálati edénybe. Az újrabehelyezésig eltelt idő nem haladhatja meg az egy órát, különben az ívási aljzat hatása szokatlan időben jelentkező egyedi párzást és ívást válthat ki. Ha valamilyen körülmény az ívási tálca későbbi behelyezését teszi szükségessé, ezt legalább 9 órával a megvilágítás kezdete után kell megtenni. E késői napszakban a tálca behelyezése már nem vált ki ívást.

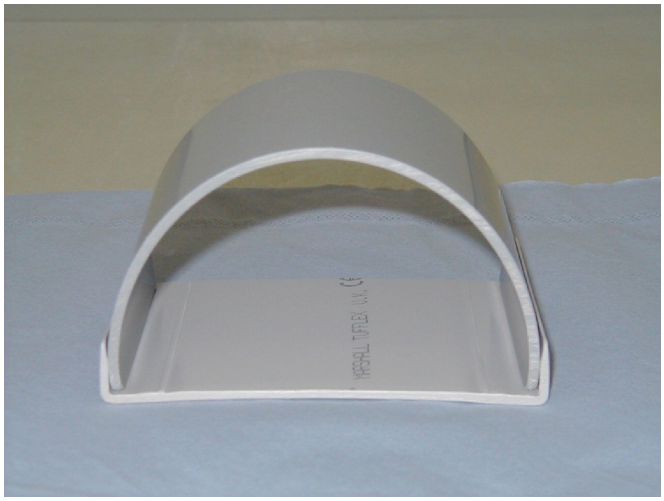
▼**M6**

4B. függelék

Ívási aljzat az amerikai cselle részére

Két vagy három kombinált műanyag/kerámia/üveg vagy rozsdamentes acél ívási lemezt és tálcát helyezünk mindegyik vizsgálati kamrába (pl. 80 mm hosszú szürke, félkör alakú ereszcsatorna-darab egy 130 mm hosszú peremes tálcára helyezve) (lásd a képet). A megfelelően előkészített PVC- vagy kerámialemezek megfelelő ívási aljzatnak bizonyultak (Thorpe és munkatársai, 2007.).

A jobb tapadás érdekében ajánlott a lemezeket megcsiszolni. Emellett a tálcát célszerű ráccsal lefedni, hogy megakadályozzuk a halak hozzáférését a lehullott ikrákhoz, kivéve, ha igazoltuk az ikráknak a használt ívási aljzathoz való hatékony tapadását.



Az alaplap célja, hogy felfogja azokat az ikrákat, amelyek nem tapadnak meg a lemez felületén és ezért a tartály aljára esnének (vagy azokat az ikrákat, amelyeket a halak közvetlenül a lapos műanyag alaplapra raktak le). Az ívási aljzatot felhasználás előtt legalább 12 órán keresztül áztatni kell a hígítóvízben.

HIVATKOZÁSOK

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

5A. függelék

A másodlagos nemi jellegek vizsgálata az amerikai csellében bizonyos endokrin rendszerre ható vegyi anyagok kimutatása céljából

Áttekintés

A hormonháztartást zavaró anyagok vizsgálata során a fizikai megjelenés potenciálisan fontos jellemzői lehetnek a felnőtt amerikai csellék esetében többek között: a testszín (azaz világos/sötét), a mintázat (azaz a függőleges sávok jelenléte vagy hiánya), a test alakja (azaz a fej és a pektorális régió alakja, a has puffadtsága), valamint a speciális másodlagos nemi jellegek (azaz a nuptiális tuberkulumok száma és mérete, a dorzális lemez és a tojócső mérete).

A nuptiális tuberkulumok a szaporodásbiológiailag aktív hím amerikai csellék fején (dorzális lemez) találhatók, és általában kétoldali szimmetrikus mintázatba rendeződnek (Jensen és munkatársai, 2001). A kontrollnőstényeken, illetve a fiatal hímeken és nőstényeken nem figyelhető meg a tuberkulumok kifejlődése (Jensen és munkatársai, 2001). A hímek szeme körül és orrlyukai között akár nyolc egyedi tuberkulum is lehet. A legtöbb és legnagyobb tuberkulum közvetlenül az orrlyukak alatt és a száj fölött, két párhuzamos vonalban található. Számos halban tuberkulumcsoportok helyezkednek el az alsó állkapocs alatt; ezek közül a szájhoz legközelebb elhelyezkedők általában egy különálló párt alkotnak, míg a ventrálisabb csoportok akár négy tuberkulumból is állhatnak. A gyakorlatban a tuberkulumok száma ritkán haladja meg a 30-at (tartomány: 18–28; Jensen és munkatársai, 2001). A (számuk tekintetében) domináns tuberkulumok különálló, viszonylag kerek képződmények, amelyek magassága körülbelül megegyezik a sugarukkal. A szaporodásbiológiailag leginkább aktív hímek többségének van legalább néhány olyan tuberkuluma, amely olyan mértékben megnagyobbodott és hangsúlyossá vált, hogy az egyes struktúrákat nem lehet megkülönböztetni.

A hormonháztartást zavaró anyagok bizonyos típusai egyes másodlagos nemi jellegek rendellenes előfordulását okozhatják a másik nemben; például az androgénreceptor-agonisták – mint a 17β-metiltesztoszteron vagy a 17β-trenbolon – nuptiális tuberkulumok kifejlődését okozhatják a nőstény amerikai csellléknél (Smith, 1974; Ankley és munkatársai, 2001, 2003), míg az ösztrogénreceptor-agonisták a hímeknél csökkenhetik a nuptiális tuberkulumok számát vagy méretét (Miles–Richardson és munkatársai, 1999; Harris és munkatársai, 2000.).

Az alábbiakban az Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynökségének (US Environmental Protection Agency) duluth-i (Minnesota állam) laboratóriumában alkalmazott eljárások alapján ismertetjük a nuptiális tuberkulumok jellemzését az amerikai cselle esetében. Az egyes termékek és/vagy berendezések hasonló rendelkezésre álló anyagokkal is helyettesíthetők.

A tuberkulumok megfigyelésére leginkább megvilágított nagyító vagy 3X nagyítású megvilágított preparálómikroszkóp alkalmas. A halat dorzális irányból és anterior részével előre vizsgáljuk (fejjel a megfigyelő felé).

a) A halat anterior részével előre és ventrális részével lefelé helyezzük kis (pl. 100 mm átmérőjű) Petri-csészébe. Fókuszáljuk a keresőt, hogy a tuberkulumok beazonosíthatók legyenek. A halat lassan, finoman forgassuk egyik oldaláról a másikra a tuberkulumterületek beazonosítása érdekében. Számoljuk meg és pontozzuk a tuberkulumokat.

b) Ismételjük meg a megfigyelést a fej ventrális felületén is úgy, hogy a halat hátára fektetve, anterior részével előre helyezzük a Petri-csészébe.

c) Az egyes halak megfigyelését 2 percen belül be kell fejezni.

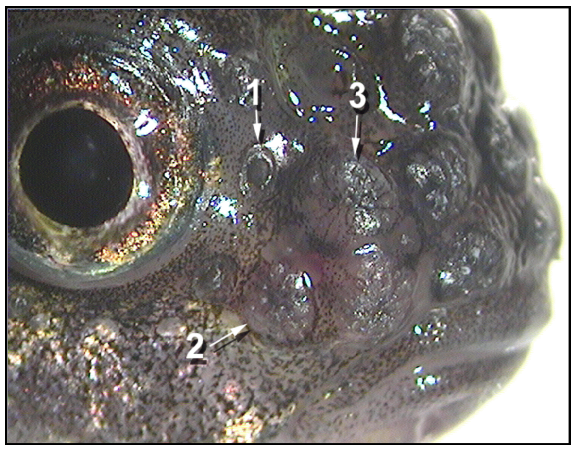
▼M6

A tuberkulumok megszámlálása és értékelése

Felnőtt amerikai cselle esetében hat specifikus területet határoztak meg, ahol meg kell vizsgálni a tuberkulumok jelenlétét és fejlődését. A jelenlévő tuberkulumok elhelyezkedésének és mennyiségének feltérképezésére kifejlesztettek egy sablont (lásd a függelék végén). Fel kell jegyezni a tuberkulumok számát; a tuberkulumok méretét az egyes organizmusokban a következőképpen lehet mennyiségileg rangsorolni: 0 – hiányzik, 1– jelen van, 2 – megnagyobbodott és 3 – kifejezett (1. ábra).

0 pont – hiányoznak a tuberkulumok. 1 pont – jelen van, és a tuberkulumnak van egy olyan pontja, amelynek magassága csaknem egyenlő a tuberkulum sugarával (átmérőjével). 2 pont – megnagyobbodott, megjelenésében csillagra emlékeztető szövet jellemzi, és rendszerint nagy sugaras alapja van a középpontból eredő bordákkal vagy barázdákkal. A tuberkulum felszíne gyakran egyenetlen, de időnként kissé lekerekedett is lehet. 3 pont – kifejezett, általában elég nagy és lekerekedett, kevésbé definiált struktúrával. Időnként ezek a tuberkulumok összefutnak és egy adott területen vagy különböző területek kombinációján összefüggő tömeget képeznek (B, C és D, alább ismertetve). A tuberkulumok színezete és struktúrája a 2 ponttal értékelt tuberkulumokéhoz hasonlít, de időnként eléggé megkülönbözhetetlen. Ez a minősítési rendszer a 18–20 tuberkulummal rendelkező normál kontrollhímek esetében általában < 50 általános tuberkulumpontszámot eredményez (Jensen és munkatársai, 2001).

1. ábra



Az adott minősítési területen lévő tuberkulumok tényleges száma néhány hal esetében meghaladhatja a sabloncellák méretét (A. függelék). Ilyen esetben a további pontszámokat a cellán belül, illetve a cellától jobbra vagy balra lehet megadni. A sablonnak ezért nem kell szimmetrikusnak lennie. További technika a páros vagy a száj vízszintes síkja mentén vertikálisan összekapcsolódott tuberkulumok feltérképezésére, hogy egy cellában két tuberkulumminősítő pontot adunk meg.

Feltérképezendő régiók:

A – a szem körül található tuberkulumok. A szem elülső pereme körül dorzális-ventrális irányban feltérképezve. A kifejlett kontrollhímeknél általában több is található, a kontrollnőstényeknél nincsenek jelen, az androgénnek kitett nőstényekben pedig általában párban (mindkét szem közelében egy pár) vagy önállóan fordulnak elő.

B – az orrnyílások (szenzoros csatorna pórusok) között találhatók tuberkulumok. A kontrollhímeknél normális esetben párokban, magasabb fejlettségi szintjen (2 – megnagyobbodott vagy 3 – kifejezett) fordulnak elő. A kontrollnőstényeknél nincsenek jelen, az androgéneknek kitett nőstényeknél alkalmanként előfordulnak és bizonyos mértékben fejlettek.

C – az orrlyukaktól közvetlenül anterior irányban, a szájjal párhuzamosan található tuberkulumok. A kifejlett kontrollhímekben általában megnagyobbodtak vagy kifejezettek. A kevésbé fejlett hímekben vagy az androgénnel kezelt nőstényekben jelen vannak vagy megnagyobbodtak.

▼M6

D – a szájvonallal párhuzamosan elhelyezkedő tuberkulumok. A kontrollhímeknél általában fejlettnek minősülnek. A kontrollnőstények esetében hiányoznak, de az androgénnek kitett nőstényeknél jelen vannak.

E – az alsó állkapcson, a száj közelében található tuberkulumok, általában kisméretűek és gyakran párban vannak. A kontroll- és a kezelt hímek, valamint a kezelt nőstények esetében változó jellemzőkkel rendelkeznek.

F – az E-vel jelölt tuberkulumoktól ventrálisan elhelyezkedő tuberkulumok. Gyakran kisméretűek és párban vannak. A kontrollhímeknél és az androgénnek kitett nőstényeknél vannak jelen.

HIVATKOZÁSOK

(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.

Tuberkulumsablon

Azonosító _____

Dátum _____

Összesített pontszám _____

Számszerű értékelés

1 – jelen van

2 – megnagyobbodot

3 – kifejezett

	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

5B. függelék

A másodlagos nemi jellegek vizsgálata a fogaspontyban egyes, az endokrin rendszerre ható vegyi anyagok kimutatása céljából

Az alábbiakban a papilláris nyúlványok (*) mérési módját ismertetjük, amelyek a fogasponty (*Oryzias latipes*) jellemző másodlagos nemi jellegei.

(*) A papilláris nyúlványok normális esetben csak felnőtt hímeknél jelennek meg és az anális úszó sugarain, az úszó hátsó végétől számított másodiktól a hetedik vagy nyolcadik úszósugárig találhatók meg (1. és 2. ábra). A nyúlványok ugyanakkor csak ritkán jelennek meg az anális úszó hátsó végétől számított első úszósugáron. Ez a szabványos eljárás kiterjed a nyúlványok első úszósugáron történő mérésére is (ebben a szabványos eljárásban az úszósugarak számjele az anális úszó hátsó végétől számított sorszámukra utal).

(1) A máj kimetszése után (6. függelék) a tetemet egy kúpos csőbe helyezzük, amely körülbelül 10 ml 10 %-os semleges pufferelt formalint tartalmaz (felső rész: fej, alsó rész: farok). Ha az ivarmirigyet 10 %-os semleges pufferelt formalintól eltérő oldatban rögzítjük, a testet keresztirányban vágjuk át borotva segítségével az anális úszó anterior régiója és a végbélnyílás között, ügyelve arra, hogy ne sértsük meg az ivarnyílást és magát az ivarmirigyet (3. ábra). Helyezzük a haltest feji végét fixálóoldatba az ivarmirigy megőrzése céljából, a haltest farki végét pedig – a fent leírtak szerint – 10 %-os semleges pufferolt formalinba.

(2) Miután a haltestet 10 %-os semleges pufferelt formalinba helyeztük, csipesszel fogjuk meg az anális úszó anterior régióját és tartsuk meghajlítva körülbelül 30 másodpercig, hogy az anális úszó nyitva maradjon. Az anális úszó csipesszel való megfogása során csak néhány úszósugarat fogjunk meg az anterior régióban, ügyelve arra, hogy ne karcoljuk meg a papilláris nyúlványokat.

(3) Miután körülbelül 30 másodpercig nyitva tartottuk az anális úszót, a haltestet a papillaris nyúlványok méréséig 10 %-os semleges pufferolt formalinban tároljuk szobahőmérsékleten (a mérést legalább 24 órával a rögzítés után kell elvégezni).

Mérés

(1) Miután a hal testét legalább 24 órán keresztül fixáltuk 10 %-os semleges pufferelt formalinban, vegyük ki a haltestet a kúpos csőből, és a formalint szűrőpapírral (vagy papírtörlővel) töröljük le.

(2) Helyezzük el a halat hassal felfelé. Kisméretű boncolóollóval óvatosan vágjuk le az anális úszót (célszerű az anális úszót a pterygiophorus kis darabjával együtt levágni).

(3) Csipesszel fogjuk meg a levágott anális úszót az elülső régióban, és néhány csepp vízzel helyezzük egy üveg tárgylemezre. Ezután fedjük le az anális úszót egy üveg fedőlemezzel. Vigyázzunk, hogy ne karcoljuk meg a papilláris nyúlványokat, amikor megfogjuk az anális úszót a csipesszel.

(4) A számláló segítségével számoljuk meg a papilláris nyúlványokkal rendelkező összekapcsolódott lemezeket biológiai mikroszkóp alatt (álló mikroszkóp vagy inverz mikroszkóp). A papilláris nyúlványt akkor fogadjuk el, ha egy kis nyúlvány kialakulása látható az összekapcsolódott

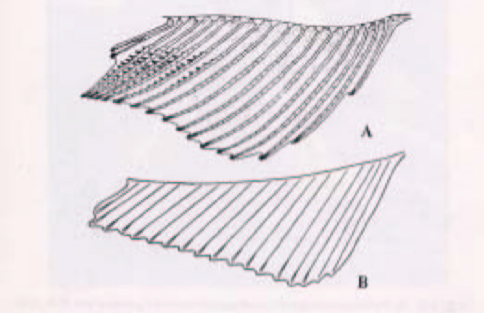
▼M6

lemez hátsó szélén. Jegyezzük fel a munkalapra a papilláris nyúlvánnyal rendelkező összekapcsolódott lemezek számát minden úszósugáron (pl. első úszósugár: 0, második úszósugár: 10, harmadik úszósugár: 12, stb.), és halanként jegyezzük fel ezeknek a számoknak az összegét az Excel-munkalapon. Szükség esetén fényképezzük le az anális úszót és a fényképen számoljuk meg a papilláris nyúlvánnyal rendelkező összekapcsolódott lemezeket.

(5) A mérés után tárolás céljából helyezzük az anális úszót az (1) pontban leírt a kúp alakú csőbe.

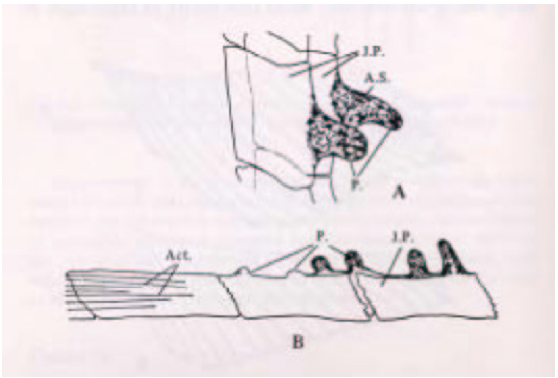
1. ábra

Az anális úszó alakjában és méretében megfigyelhető ivarok közötti különbséget bemutató ábra. A: hím; B: nőstény. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



2. ábra

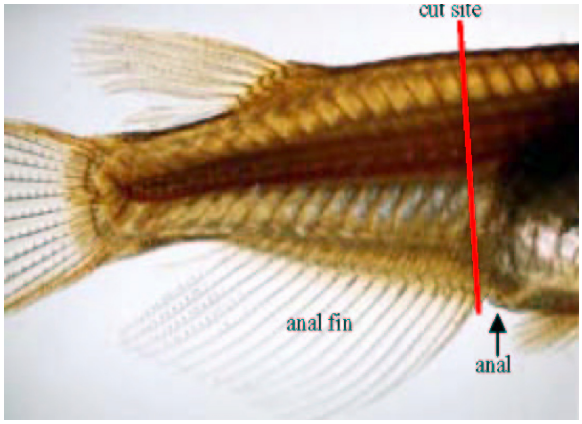
A: nyúlványok az anális úszósugár összekapcsolódott lemezein. J.P.: összekapcsolódott lemez; A.S.: axiális tér; P.: nyúlvány. B: az úszósugár disztális vége. Actinotrichia (Act.) az úszósugár hegyén. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



▼M6

3. ábra

A hal testéről készült fénykép a kettévágás helyével, amelyet az ivarmirigy 10 %-os semleges pufferelt formalintól eltérő fixálóoldatban való rögzítése esetén kell elvégezni. Ebben az esetben a testet az anális úszó anterior régiója és a végbélnyílás között borotva segítségével kettévágjuk (piros vonal), majd a haltest feji része az ivarmirigy-fixálóoldatba, míg a haltest farki része 10 %-os semleges pufferelt formalinba kerül.



▼M6

6. függelék

A vitellogenininanalízis céljára ajánlott mintavételi eljárások

Ügyelni kell arra, hogy elkerüljük a hímekből és nőstényekből vett VTG-minták közötti keresztszennyeződést.

1A. eljárás: Amerikai cselle, vérvétel farokvénából/-artériából

Érzéstelenítés után a faroktövet szikével részben átvágjuk, és heparinnal kezelt mikrohematokrit kapilláriscsővel vért gyűjtünk a farokvénából/-artériából. Miután a vért levettük, a vérplazmát 3 percig 15 000 *g* -vel (vagy alternatív megoldásként 10 percig 15 000 g-vel 4 °C-on) történő centrifugálással gyorsan elkülönítjük. Centrifugálás után szükség esetén meg lehet határozni a százalékos hematokritértéket. A plazmarészt ezután eltávolítjuk a mikrohematokrit csőből, és 0,13 egység aprotinin (proteáz-inhibitor) hozzáadása után a vitellogeninmeghatározás elvégzéséig centrifugacsőben, -80 °C hőmérsékleten tároljuk. A begyűjthető vérplazmatérfogat az amerikai cselle méretétől függően (ami ivarfüggő) általában 5–60 mikroliter/hal (Jensen és munkatársai, 2001).

1B. eljárás: Amerikai cselle, vérvétel szívből

Alternatív megoldásként a vért szívpunkcióval is gyűjthetjük heparinnal kezelt fecskendő használatával (1 000 egység heparin/ml). A vért (jégen tartott) Eppendorf-csövekbe töltjük át, majd centrifugáljuk (5 perc, 7 000 g, szobahőmérséklet). A vérplazmát tiszta Eppendorf-csövekbe töltjük át (alikvotokban, ha a vérplazma térfogata ezt lehetővé teszi), majd -80 °C-on azonnal lefagyasztjuk és az analízisig így tároljuk (Panter és munkatársai, 1998).

2A. eljárás: Japán fogasponty, a máj kimetszése a fogasponty esetében

A vizsgálati halak eltávolítása a vizsgálati kamrából

(1) A vizsgálati halakat kis merítőhálóval kell eltávolítani a vizsgálati kamrából. Vigyázzunk, hogy ne ejtsük bele a vizsgálati halakat egy másik vizsgálati kamrába.

(2) A vizsgálati halakat elvileg a következő sorrendben kell eltávolítani: kontroll, oldószeres kontroll (adott esetben), legalacsonyabb koncentráció, közepes koncentráció, legmagasabb koncentráció és pozitív kontroll. Ezenkívül az összes hímet el kell távolítani a vizsgálati kamrából, mielőtt a nőstények eltávolítására sor kerülne.

(3) A vizsgálati halak ivarát a külső másodlagos nemi jellegek alapján állapíthatjuk meg (pl. az anális úszó alakja).

(4) Tegyük a vizsgálati halakat egy szállítótartályba és vigyük át a máj kimetszésére szolgáló munkaállomásra. Ellenőrizzük, hogy a vizsgálati kamra és a szállítótartály címkéje pontos adatokat tartalmaz-e, illetve erősítsük meg, hogy a vizsgálati kamrából eltávolított halak száma és a kamrában maradó halak száma összhangban van-e az elvárttal.

(5) Ha az ivart a halak külső megjelenése alapján nem lehet azonosítani, távolítsuk el az összes halat a vizsgálati kamrából. Ebben az esetben az ivart az ivarmirigy vagy a másodlagos nemi jellemzők sztereomikroszkóp alatti megfigyelésével kell meghatározni.

▼**M6**

A máj kimetszése

(1) A vizsgálati halat kis merítőhálóval helyezzük át a szállítótartályból az érzéstelenítő oldatba.

(2) Érzéstelenítés után csipesszel (kereskedelmi forgalomban kapható típus) helyezzük át a szűrőpapírra (vagy papírtörlőre). A vizsgálati halat a fej két oldalán fogjuk meg a csipesszel, hogy elkerüljük a farok eltörését.

(3) Töröljük le a vizet a szűrőpapírral (vagy a papírtörlővel) a vizsgálati hal testének felületéről.

(4) Helyezzük el a halat hassal felfelé. Boncolóollóval készítsünk egy kis keresztirányú bemetszést félúton a ventrális nyaki régió és a középhasi régió között.

(5) Vezessük be a boncolóollót a kis bemetszésbe, majd a kopoltyúfedőtől kaudális irányban elhelyezkedő ponttól a végbélnyílás kraniális széléig vágjuk fel a hasat a has középvonala mentén. Vigyázzunk, hogy ne vezessük be túl mélyen a boncolóollót, nehogy károsodjon a máj és az ivarmirigy.

(6) A következő műveleteket sztereomikroszkóp alatt végezzük.

(7) Tegyük a vizsgálati halat hassal felfelé a papírtörlőre (üveg Petri-csésze vagy tárgylemez is rendelkezésre áll).

(8) Precíziós csipesszel húzzuk szét a hasüreg falait, és tárjuk fel a belső szerveket. Szükség esetén az is elfogadható, ha a belső szerveket a hasüreg egyik falának eltávolításával tárjuk fel.

(9) Egy másik precíziós csipesszel tárjuk fel a máj és az epehólyag kapcsolódó részét. Ezután fogjuk meg az epevezetéket, és vágjuk le az epehólyagot. Vigyázzunk, nehogy kilyukasszuk az epehólyagot.

(10) Fogjuk meg a nyelőcsövet, és ugyanígy vágjuk le a gyomor-bél traktust a májról. Vigyázzunk, nehogy kiszivárogjon a gyomor- és béltartalom. Vágjuk le a kaudális gyomor-bél traktust a végbélnyílásról, és távolítsuk el a hasüregből.

(11) Metsszük le a zsírt és az egyéb szöveteket a májperifériáról. Vigyázzunk, nehogy felsértsük a májat.

(12) Fogjuk meg a máj portális területét a precíziós csipesszel, és távolítsuk el a májat a hasüregből.

(13) Helyezzük a májat a tárgylemezre. Szükség esetén a máj felületéről precíziós csipesszel távolítsunk el minden további zsírt és külső szövetet (pl. hasüreget bélelő szövetek).

(14) Elektronikus analitikai mérlegen mérjük meg a máj tömegét 1,5 ml-es mikrocsővel mint tárával együtt. Jegyezzük fel az értéket a munkalapra (leolvasás: 0,1 mg) Jegyezzük fel az azonosító adatokat a mikrocső címkéjére.

(15) Zárjuk le a májat tartalmazó mikrocső kupakját. Hűtőrácson (vagy fagyasztócső-tartóállványon) tároljuk.

(16) A máj kimetszése után tisztítsuk meg a boncolóeszközöket vagy cseréljük le azokat tiszta eszközökre.

▼M6

(17) A szállítótartályban található minden halból távolítsuk el a májat a fent leírtak szerint.

(18) Miután a szállítótartályban lévő összes halból kivágtuk a májat (azaz az adott vizsgálati kamrából származó minden hímből vagy nőstényből), helyezzük az összes májmintát azonosító címkével ellátva egy csőtartó állványra, és fagyasztóban tároljuk. Ha a májakat kimetszés után nem sokkal előkezelésre bocsátjuk, a mintadarabokat hűtőállványon (vagy fagyasztócső-tartóállványon) vigyük át a következő munkaállomásra.

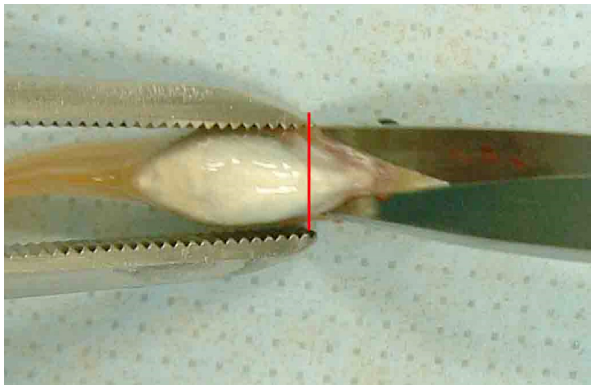
A hal teste a máj kimetszését követően felhasználható a másodlagos nemi jellegek vizsgálatára.

Mintadarab

Ha a vizsgálati halakból vett májmintákat röviddel a kimetszés után nem használjuk fel előkezelésre, akkor ≤ – 70 °C-on kell azokat tárolni.

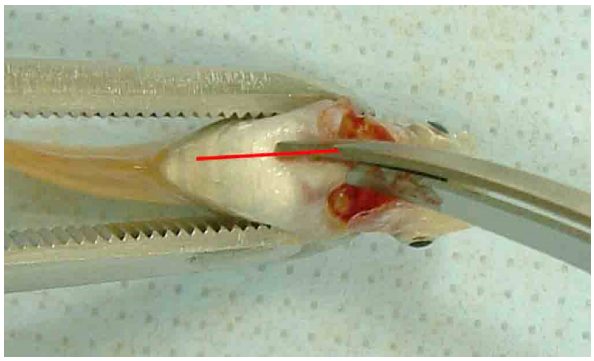
1. ábra

Ollóval egy bemetszést készítünk közvetlenül a mellúszók előtt.



2. ábra

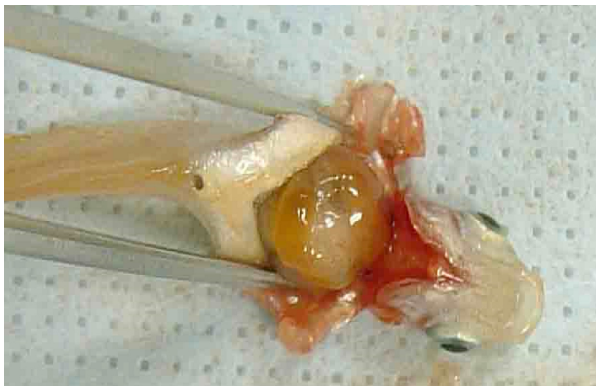
A has középvonalát a végbélnyílástól körülbelül 2 mm-re kraniálisan elhelyezkedő pontig ollóval felvágjuk.



▼M6

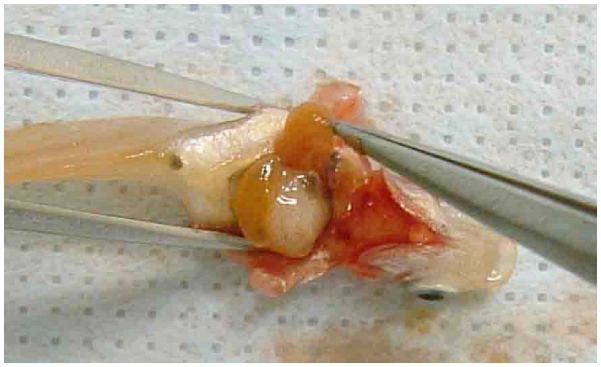
3. ábra

A hasfalat a máj és az egyéb belső szervek szabaddá tétele céljából fogóval kitárjuk. (Alternatív megoldásként a hasfalat oldalra is le lehet tűzni.)



4. ábra

A májat fogóval tompán feltárjuk és kimetsszük.



5. ábra

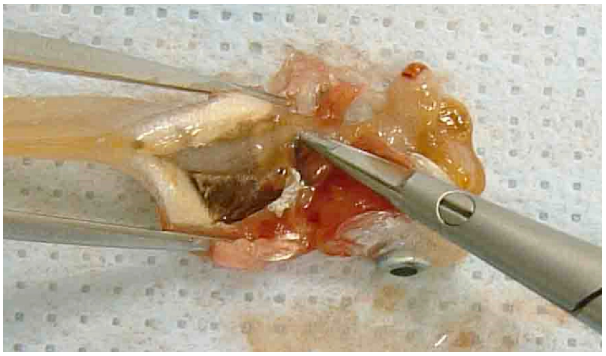
A beleket fogóval óvatosan visszahúzzuk.



▼M6

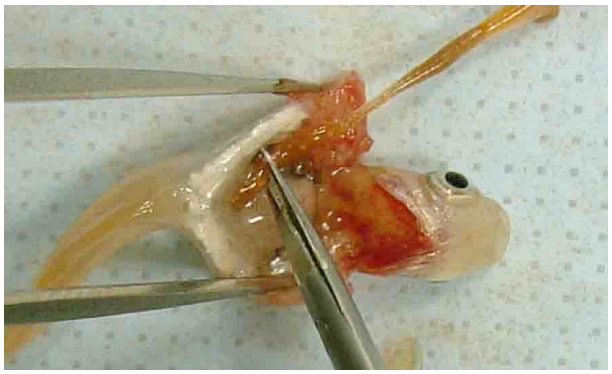
6. ábra

A belek mindkét végét és a mesenterialis függelékeket ollóval elvágjuk.



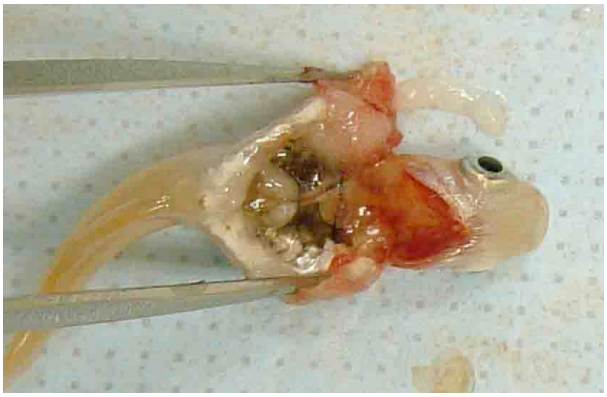
7. ábra (nőstény)

Az eljárás a nőstények esetében is ugyanaz.



8. ábra

A befejezett eljárás.



2B. eljárás: Japán fogasponty (*Oryzias latipes*), a máj előkezelése vitellogeninanalízishez

Vegyük ki a homogenizáló puffert az ELISA-készletből, és zúzott jéggel hűtsük le (az oldat hőmérséklete: ≤ 4 °C). Ha az Enbio ELISA rendszer homogenizáló pufferét használjuk, az oldatot szobahőmérsékleten olvasszuk fel, majd a palackot zúzott jéggel hűtsük le.

▼**M6**

A májhoz szükséges homogenizáló puffer térfogatát a máj tömege alapján számítsuk ki (a homogenizátum elkészítéséhez egy mg májhoz 50 µl homogenizáló puffert kell adni). Például ha a máj tömege 4,5 mg, a májhoz adandó homogenizáló puffer mennyisége 225 µl. Készítsünk egy listát a májakhoz szükséges homogenizáló puffer térfogatáról.

A máj előkészítése az előkezeléshez

(1) A májat tartalmazó 1,5 ml-es mikrocsövet közvetlenül az előkezelés előtt vegyük ki a fagyasztóból.

(2) A vitellogeninszennyeződés megelőzése érdekében a hímekből származó májak előkezelését a nőstényekből származó májak előkezelése előtt kell elvégezni. Ezen túlmenően a vizsgálati csoportok előkezelését a következő sorrendben kell lefolytatni: kontroll, oldószeres kontroll (adott esetben), legalacsonyabb koncentráció, középső koncentráció, legmagasabb koncentráció és pozitív kontroll.

(3) A fagyasztóból egy adott időpontban kivett – májmintákat tartalmazó – 1,5 ml-es mikrocsövek száma nem haladhatja meg az abban az időpontban lecentrifugálható mikrocsövek számát.

(4) A májmintákat tartalmazó 1,5 ml-es mikrocsöveket a mintadaraboknak a fagyasztócső-tartóállványon használt sorszámai szerinti sorrendben rendezzük el (a májakat nem kell felolvasztani).

Az előkezelés végrehajtása

1. A homogenizáló puffer hozzáadása

(1) Ellenőrizzük a listán a homogenizáló puffernek az adott májmintához használandó térfogatát és állítsuk be a mikropipettát (térfogattartomány: 100–1 000 µl) a megfelelő térfogatra. Csatlakoztassunk egy tiszta hegyet a mikropipettához.

(2) Szívjuk fel a homogenizáló puffert a reagenspalackból, és adjuk hozzá a puffert a májat tartalmazó 1,5 ml mikrocsőhöz.

(3) A májat tartalmazó valamennyi 1,5 ml-es mikrocsőhöz adjuk hozzá a homogenizáló puffert a fent leírt eljárás szerint. A mikropipetta hegyét nem kell kicserélni. Ha azonban a pipettahegy szennyezett vagy feltehetően szennyezett, a hegyet ki kell cserélni.

2. A máj homogenizálása

(1) A homogenizáláshoz csatlakoztassunk egy új mozsártörőt a mikrocső-homogenizátorhoz.

(2) Vezessük be a mozsártörőt a 1,5 ml-es mikrocsőbe. Tartsuk úgy a mikrocső-homogenizátort, hogy a májat a mozsártörő felülete és a 1,5 ml-es mikrocső belső fala közé préselje.

(3) Kapcsoljuk be a mikrocső-homogenizátort 10–20 másodpercre. A művelet során zúzott jéggel hűtsük a 1,5 ml-es mikrocsövet.

(4) Emeljük ki a mozsártörőt a 1,5 ml-es mikrocsőből, és hagyjuk a csövet körülbelül 10 másodpercig nyugalomban. Ezután vizuálisan ellenőrizzük a szuszpenzió állapotát.

(5) Ha májdarabok figyelhetők meg a szuszpenzióban, ismételjük meg a (3) és (4) műveletet, hogy kielégítő minőségű májhomogenizátumot készíthessünk.

▼M6

(6) A centrifugálásig jégállványon hűtsük a szuszpendált májhomogenizátumot.

(7) A mozsártörőt minden homogenizátumhoz újra kell cserélni.

(8) Az összes májat homogenizáljuk a homogenizáló pufferrel a fent leírt eljárás szerint.

3. A szuszpendált májhomogenizátum centrifugálása

(1) Ellenőrizzük a hűtött centrifugakamra hőmérsékletét (≤ 5 °C).

(2) Helyezzük be a szuszpendált májhomogenizátumot tartalmazó 1,5 ml-es mikrocsöveket a hűtött centrifugába (egyensúlyozzuk ki, ha szükséges).

(3) A szuszpendált májhomogenizátumot 10 percig centrifugáljuk ≤ 5 °C hőmérsékleten 13 000 g-vel. Ugyanakkor ha a felülúszók megfelelően elválnak, a centrifugálás sebességét és időtartamát szükség szerint módosítani lehet.

(4) A centrifugálás után ellenőrizzük, hogy a felülúszók megfelelően elkülönültek-e (felszín: lipid, középső réteg: felülúszó, alsó réteg: májszövet). Ha az elkülönülés nem megfelelő, azonos körülmények mellett ismét centrifugáljuk le a szuszpenziót.

(5) Távolítsunk el minden mintadarabot a hűtött centrifugából, és helyezzük el azokat a fagyasztócső-tartóállványon a mintadarabok sorszámának megfelelően. Vigyázzunk, nehogy a centrifugálás után újraszuszpendáljuk a már elválasztott rétegeket.

4. A felülúszó gyűjtése

(1) Helyezzünk a csőtartó állványba négy db 0,5 ml-es mikrocsövet a felülúszó tárolására.

(2) Mikropipettával vegyünk ki 30 µl-t minden felülúszóból (a középső rétegben különül el), és töltsük át egy 0,5 ml-es mikrocsőbe. Vigyázzunk, hogy ne szívjuk fel a felszínen található lipidet vagy az alsó réteg található májszövetet.

(3) A fentebb leírtakkal megegyező módon gyűjtsük össze a felülúszót, és töltsük át két másik 0,5 ml-es mikrocsőbe.

(4) Gyűjtsük össze a maradék felülúszót a mikropipettával (lehetőség szerint: ≥ 100 µl). Ezután töltsük a felülúszót a fennmaradó 0,5 ml-es mikrocsőbe. Vigyázzunk, hogy ne szívjuk fel a felszínen található lipidet vagy az alsó réteg található májszövetet.

(5) Zárjuk le a 0,5 ml-es mikrocső kupakját, és írjuk rá a címkére a felülúszó térfogatát. Ezután azonnal hűtsük le a mikrocsöveket a fagyasztócső-tartóállványon.

(6) A mikropipetta hegyét minden felülúszónál cseréljük újra. Ha nagy mennyiségű lipid halmozódik fel a mikropipetta hegyén, a májkivonat zsírral való szennyeződésének elkerülése érdekében azonnal cseréljük le egy új hegyre.

(7) Az összes lecentrifugált felülúszót osszuk szét négy 0,5 ml-es mikrocsőbe a fent leírt eljárás szerint.

▼M6

(8) Miután szétöntöttük a felülúszót a 0,5 ml-es mikrocsövekbe, helyezzük az azonosító címkével ellátott mikrocsöveket a csőtartó állványba, majd fagyasztóban azonnal fagyasszuk őket le. Ha a VTG koncentrációját az előkezelés után azonnal megmérjük, tartsunk egy, a csőtartó állványban elhelyezkedő 0,5 ml-es mikrocsövet (a 30 µl felülúszót tartalmazó csövet) hűvös állapotban, és vigyük át arra a munkaállomásra, ahol az ELISA-vizsgálatot fogjuk végezni. Ebben az esetben a többi mikrocsövet helyezzük a csőtartó állványba, és fagyasszuk le fagyasztóban.

(9) A felülúszó begyűjtését követően a maradékot megfelelően semmisítsük meg.

A minta tárolása

A májhomogenizátum felülúszóját tartalmazó 0,5 ml-es mikrocsöveket az ELISA-vizsgálatban történő felhasználásig ≤ – 70 °C-on tároljuk.

3A. eljárás: Zebradánió, vérvétel farokvénából/-artériából

A faroktövet közvetlenül az érzéstelenítés után keresztben átvágjuk, és heparinnal kezelt mikrohematokrit kapilláriscsővel felfogjuk a vért a farokvénából/-artériából. A vér térfogata a hal méretétől függően 5–15 µl. A mikrokapilláris-csőbe azonos térfogatú aprotinin puffert (6 µg/ml PBS-ben) adunk, és a vérplazmát centrifugálással (5 perc, 600 g) szeparáljuk a vérből. A vérplazmát a kémcsövekben gyűjtjük össze, és a vitellogenin vagy az egyéb vizsgált fehérjék analizálásáig – 20 °C-on tároljuk.

3B. eljárás: Zebradánió, vérvétel szívpunkcióval

A véralvadás és a fehérjék lebomlásának elkerülése érdekében a mintákat heparint (1 000 egység/ml) és aprotinin proteázinhibitort (2 TIU/ml) tartalmazó foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS) gyűjtjük. A puffer összetevőjeként heparin-ammóniumsó és liofilizált aprotinin használata ajánlott. A vérvétel céljára fecskendő (1 ml) használata ajánlott rögzített vékony tűvel (pl. Braun Omnikan-F). A fecskendőt előre meg kell tölteni a pufferrel (körülbelül 100 µl), hogy teljesen feloldja a halakból származó kis vértérfogatokat. A vérmintát szívpunkcióval vesszük. Először a halat MS-222 oldattal (100 mg/l) érzéstelenítjük. Megfelelő érzéstelenítéssel kivehetővé válik a zebradánió szívverése. A szív megszúrása közben enyhe nyomást fejtünk ki a fecskendő dugattyújára. A begyűjthető vértérfogat 20–40 mikroliter között van. A szívpunkció után a vérpuffer keveréket a kémcsőbe töltjük. A vérplazmát a vérből centrifugálással (20 perc, 5 000 g) különítjük el, és az analízisig – 80 °C-on tároljuk.

3C. eljárás: Szabványos eljárás: Zebradánió, fej/farok homogenizátum készítése

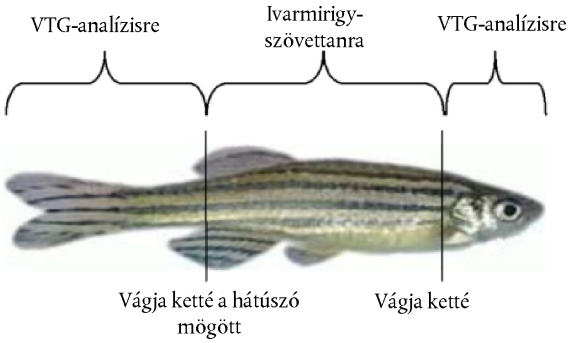
(1) A halakat a vizsgálati leírásnak megfelelően érzéstelenítjük és túlaltatjuk.

(2) A halak fejét és farkát az 1. ábrának megfelelően levágjuk.

Fontos megjegyzés: A nem indukált hímek nőstényektől vagy indukált hímektől eredő „vitellogeninszennyeződésének” megelőzése céljából a boncolóeszközöket, valamint a vágódeszkát az egyes halak kezelése között le kell öblíteni és alaposan meg kell tisztítani (pl. 96 %-os etanollal).

▼**M6**

1. ábra



(3) Az egyes halak fejének és farkának együttesen mért tömegét a legközelebbi mg-ra kerekítjük.

(4) A mérés után a testrészek megfelelő (pl. 1,5 ml-es Eppendorf-) csövekbe kerülnek, és – 80 °C-on homogenizálódásig fagyasztjuk, vagy jégen két műanyag bibével közvetlenül homogenizáljuk azokat. (Más módszerek is használhatók, ha azokat jégen végezzük, és homogén tömeget eredményeznek). Fontos megjegyzés: A csöveket megfelelően meg kell számozni, hogy az adott halból származó fejet és farkat össze lehessen kapcsolni az ivarmirigy szövettani vizsgálatához használt megfelelő törzsdarabbal.

(5) Ha homogén masszát kaptunk, a szövet tömegének 4-szeresét kitevő mennyiségű jéghideg homogenizáló puffert (*) adunk hozzá. Dolgozzunk tovább a bibékkel, amíg a keverék homogén nem lesz. Fontos megjegyzés: Minden halhoz új bibét kell használni.

(6) A mintákat a 4 °C-on 50 000 g-vel 30 percig zajló centrifugálásig jégre tesszük.

(7) A felülúszóból pipettával vigyünk át 20 µl térfogatú adagokat legalább két csőbe úgy, hogy a pipetta hegyét merítsük a felületen lévő zsírréteg alá és óvatosan szívjuk fel a zsír- vagy pelletfrakció nélküli felülúszót.

(8) A csöveket felhasználásig – 80 °C hőmérsékleten tároljuk.

(*) **Homogenizáló puffer:**

— (50 mmol trisz-HCl, pH 7,4; 1 % proteázgátló koktél (Sigma)): 12 ml trisz-HCl pH = 7,4 + 120 µl proteázgátló koktél.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) pl. Bie & Berntsen, Dánia.

— Proteázgátló koktél: Sigmából (emlősszövetekhez) Termékszám P 8340.

— *Megjegyzés:* A homogenizáló pufferoldatot a készítés napján fel kell használni. Használat közben helyezzük jégre.

▼M6

7. függelék

Dúsított vitellogeninminták és inter-assay (vizsgálatközi) referenciastandard

Minden olyan napon, amikor vitellogeninvizsgálatokat végzünk, egy inter-assay referenciastandard felhasználásával készült dúsított mintát is analizálunk. Az inter-assay referenciastandard készítéséhez használt vitellogeninnek az elvégzendő vizsgálat céljára készített kalibrációs standardokban használt vitellogenintől eltérő tételből kell származnia.

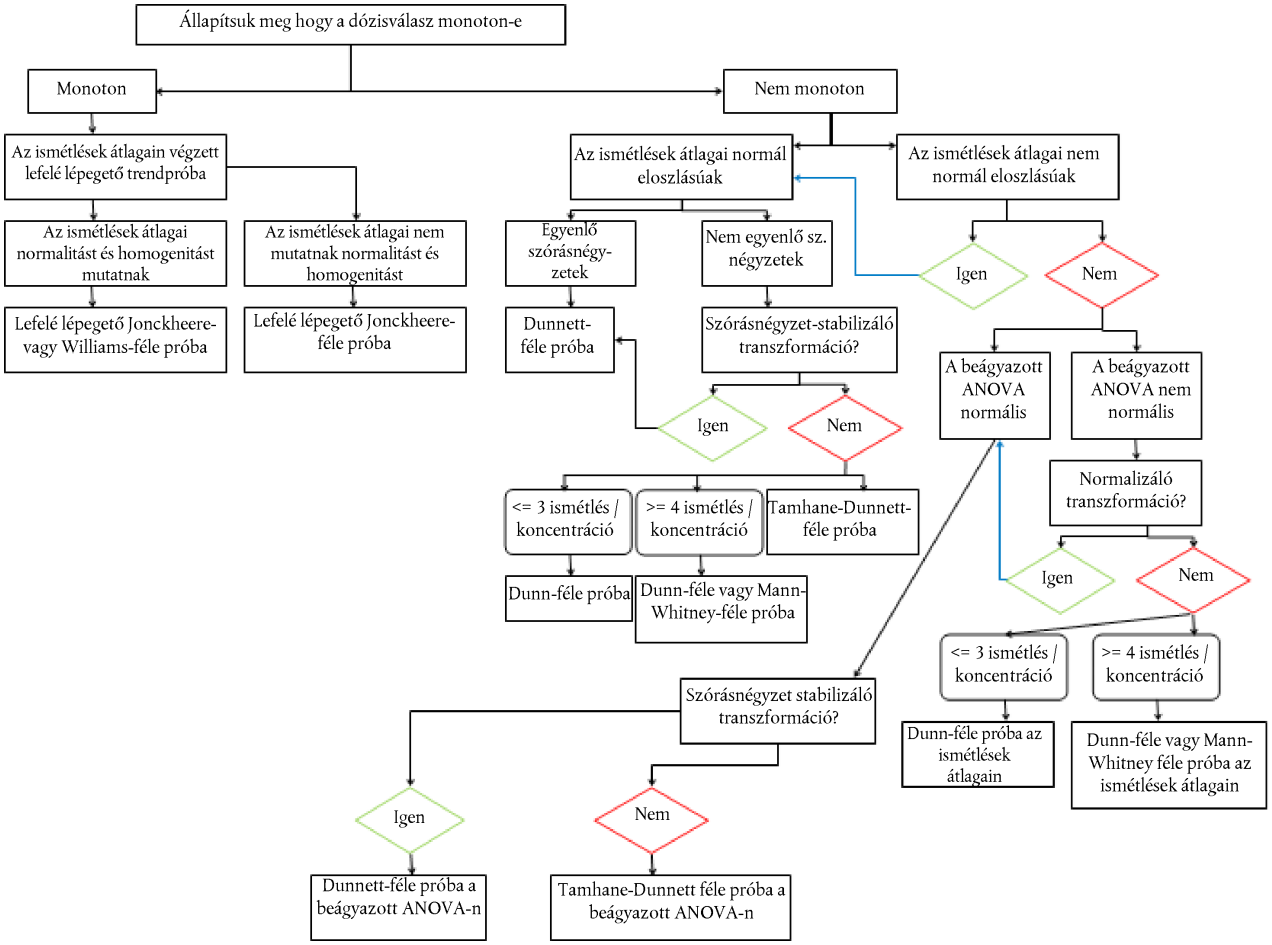
A dúsított minta ismert mennyiségű inter-assay standardnak egy kontrollhím vérplazmájából vett mintához történő hozzáadásával készül. A mintát azért kell feldúsítani, hogy a vitellogenin koncentrációja elérje a kontrollcsoportban lévő hím halakban várható vitellogeninszint 10–100-szorosát. A kontrollhím vérplazmájából vett dúsítandó minta származhat egyetlen halból vagy lehet több halból származó kompozit minta is.

A kontrollhímből vett vérplazma nem dúsított részmintáját legalább két lyukban analizáljuk. A dúsított mintát is legalább két lyukban analizáljuk. A várható koncentráció meghatározásához a vitellogeninnek a kontrollhím vérplazmájából vett két nem dúsított mintában mért átlagos mennyiségét hozzá kell adni a dúsított mintákhoz adott vitellogenin számított mennyiségéhez. E várható koncentrációnak a mért koncentrációhoz viszonyított arányát az adott napon elvégzett valamennyi vizsgálat eredményeivel együtt jegyzőkönyvezni kell.

▼M6

8. függelék

Döntési folyamatábra a statisztikai elemzési módszer kiválasztásához



02008R0440 — HU — 16.10.2019 — 008.001 — 2200

▼M6

C.38. KÉTÉLTŰ-ÁTALAKULÁSI VIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 231. vizsgálati iránymutatásában (2009) leírt módszerrel. A gerinces fajok pajzsmirigyrendszerében aktív vegyi anyagok kimutatására alkalmas vizsgálat kifejlesztése és validálása iránti igény azokból az aggodalmakból ered, hogy egyes vegyi anyagok a környezetben előforduló mennyiségben káros hatással lehetnek az emberekre és az élővilágra egyaránt. 1998-ban az OECD a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint az endokrin rendszert esetlegesen károsító anyagok kiszűrését és vizsgálatát célzó új vizsgálati iránymutatások kidolgozására irányuló, kiemelt fontosságú tevékenységet indított. E tevékenység egyik eleme a gerinces fajok pajzsmirigyrendszerére ható vegyi anyagok kiszűrésére vonatkozó vizsgálati iránymutatás kidolgozása volt. A rágcsálókon végzett ismételt adagolású, 28 napos orális toxicitási vizsgálat (e melléklet B.7. fejezete) továbbfejlesztését, és a kétéltű-átalakulási vizsgálat (AMA) bevezetését egyaránt javasolták. A továbbfejlesztett B.7. vizsgálati módszert validálási eljárásnak vetették alá, és kiadták a felülvizsgált vizsgálati módszert. A kétéltű-átalakulási vizsgálat (AMA) laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti vizsgálatokból álló alapos ellenőrzési programon esett át, amely igazolta a vizsgálat relevanciáját és megbízhatóságát (1, 2). Ezt követően a vizsgálat validálását egy független szakértőkből álló testület szakértői értékelésének vetették alá (3). Ez a vizsgálati módszer a pajzsmirigyre ható vegyi anyagok kimutatására szolgáló validálási vizsgálatok során szerzett tapasztalatok, illetve az OECD más tagországaiban végzett munka eredménye.

A VIZSGÁLAT ELVE

2. A kétéltű-átalakulási vizsgálat (Amphibian Metamorphosis Assay, AMA) egy szűrővizsgálat, amelynek célja, hogy empirikusan azonosítsa azokat a vegyi anyagokat, amelyek megzavarhatják a hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy (HHP) tengely normális működését. Az AMA egy általánosított gerinces modell abban a tekintetben, hogy a HHP-tengely konzervált struktúráin és funkcióin alapul. Ez egy fontos vizsgálat, mivel a kétéltűek átalakulása olyan – alaposan tanulmányozott, pajzsmirigyfüggő – folyamat, amely reagál a HHP-tengely mentén ható vegyi anyagokra, és ez az egyetlen létező vizsgálati eljárás, amely kimutatja a pajzsmirigyhormon-aktivitást a morfológiai fejlődésen áteső állatokban.

3. Az általános vizsgálati terv keretében 51. stádiumban lévő *Xenopus laevis* ebihalakat tesznek ki a vizsgált vegyi anyag legalább három különböző koncentrációjának és hígítóvizes kontrollnak 21 napon keresztül. Minden vizsgálati kezelés négy ismétlésből áll. A lárvasűrűség a vizsgálat kezdetén minden kezelési csoportban 20 ebihal vizsgálati tartályonként. A megfigyelt végpontok a hátsó végtagok hossza, a farok nélküli testhossz, a fejlődési stádium, a nedves tömeg, a pajzsmirigy szövettana és a naponta megfigyelt mortalitási arány.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

A vizsgálathoz használt faj

4. A *Xenopus laevis* fajt világszerte rutinszerűen tenyésztik a laboratóriumokban, és könnyen beszerezhető kereskedelmi forgalomban is. A szaporodás e faj esetében egész évben könnyen kiváltható humán koriogonadotropin (HCG) injekcióval, és az így kapott nagyszámú lárvát rutinszerűen fel lehet nevelni a kiválasztott fejlődési stádiumig, ami lehetővé teszi a stádiumspecifikus vizsgálati protokollok használatát. Előnyös, ha a vizsgálathoz

▼M6

használt lárvák házon belül nevelt felnőtt egyedektől származnak. Alternatív megoldásként – bár nem ez az előnyben részesítendő eljárás – a peték vagy az embriók máshonnan is a vizsgálatot végrehajtó laboratóriumba szállíthatók, majd ott akklimatizálhatók; a lárvastádiumban lévő vizsgálati egyedek szállítása azonban nem elfogadható.

Berendezések és kellékek

5. A következő berendezések és kellékek szükségesek a vizsgálat elvégzéséhez:

a) Expozíciós rendszer (lásd az alábbi leírást);

b) Üveg- vagy rozsdamentes acél akváriumok (lásd az alábbi leírást);

c) Tenyésztőtartályok;

d) Hőmérséklet-szabályozó készülék (pl. fűtőtestek vagy hűtőberendezések (22 ± 1 °C-ra beállítható));

e) Hőmérő;

f) Binokuláris preparálómikroszkóp;

g) Legalább 4 megapixel felbontású és mikrofunkcióval rendelkező digitális fényképezőgép;

h) Képdigitalizáló szoftver;

i) Petri-csésze (pl. 100 × 15 mm) vagy hasonló méretű átlátszó műanyag kamra;

j) 3 tizedesjegyig mérni képes analitikai mérleg (mg);

k) Készülék az oldott oxigén mérésére;

l) pH-mérő;

m) Lux egységek mérésére képes fényerősségmérő;

n) Különböző laboratóriumi üvegedények és eszközök;

o) Állítható pipetták (10–5 000 μl) vagy ezzel megegyező méretű, válogatott pipetták;

p) A vizsgált vegyi anyag a vizsgálat elvégzéséhez elegendő mennyiségben, lehetőleg egy tétel;

q) A vizsgált vegyi anyagnak megfelelő analitikai műszerek vagy szerződött analitikai szolgáltatók.

Kémiai vizsgálhatóság

6. Az AMA vizes expozíciós protokollon alapul, melynek során a vizsgált vegyi anyag átfolyásos rendszeren át kerül be a vizsgálati kamrákba. Az átfolyásos módszerek azonban – a vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságai alapján – korlátozzák a vizsgálható vegyi anyagok körét. Ezért e protokoll használata előtt be kell gyűjteni a vegyi anyagra vonatkozó, a vizsgálhatóság meghatározása szempontjából releváns alapinformációkat, illetve tanulmányozni kell „A nehezen vizsgálható anyagok és keverékek vízi

▼M6

toxikológiai vizsgálata” című OECD-iránymutatást (4). A vegyi anyag vízes rendszerekben való nehéz vizsgálhatóságára utaló jellemzők közé tartozik a magas oktanol-víz megoszlási hányados (log K_{ow}), a magas illékonyság, a hidrolízisre való hajlam és a fotolizálásra való hajlam laboratóriumi környezeti fényviszonyok mellett. Egyéb tényezők is fontosak lehetnek a vizsgálhatóság meghatározása szempontjából, amelyeket eseti alapon kell meghatározni. Ha a vegyi anyag átfolyásos vizsgálati rendszerben sikeresen nem vizsgálható, statikus megújítási rendszer is alkalmazható. Ha a vizsgált vegyi anyaggal egyik rendszer sem egyeztethető össze, akkor alapértelmezés szerint a vegyi anyag nem vizsgálható ezzel a protokollal.

Expozíciós rendszer

7. Lehetőség szerint az átfolyásos hígítórendszert kell előnyben részesíteni a statikus megújítási rendszerrel szemben. Ha a vizsgált vegyi anyagok bármelyikének fizikai és/vagy kémiai tulajdonságai nem megfelelőek az átfolyásos hígítórendszerhez, akkor eltérő expozíciós rendszer (pl. statikus megújítási rendszer) alkalmazható. A rendszer vízzel érintkező elemeinek üvegből, rozsdamentes acélból és/vagy politetrafluor-etilénből kell készülnie. Ugyanakkor a célnak megfelelő műanyagokat is lehet használni, ha azok nem veszélyeztetik a vizsgálatot. Expozíciós tartályként üvegből vagy rozsdamentes acélból készült, feltöltőcsővel felszerelt akváriumot kell használni, megközelítőleg 4,0 és 10,0 liter közötti tartálytérfogattal és 10–15 cm minimális vízmélységgel. A rendszernek képesnek kell lennie valamennyi expozíciós koncentráció és a kontroll számára megfelelő feltételeket biztosítani, kezelésenként négy ismétlésben. Az egyes tartályok áramlási sebességének állandónak kell lennie a biológiai feltételek, valamint a vegyi anyaggal történő expozíció fenntartása (pl. 25 ml/perc) érdekében. Az expozíciós rendszeren belül a kezelési tartályokat véletlenszerűen kell egy-egy térbeli pozícióhoz rendelni, hogy csökkenteni lehessen a pozícióból fakadó lehetséges hatásokat, köztük a hőmérséklet, a fényerő stb. enyhe eltéréseit. Fluoreszcens megvilágítást kell alkalmazni 12-12 órás megvilágítási időszak mellett, 600–2 000 lux (lumen/m^2) vízfelszínen mért fényerővel. A vizsgálati tartályokban a víz hőmérsékletét 22 ± 1 °C-on, a pH-t 6,5 és 8,5 között, az oldott oxigén koncentrációját pedig > 3,5 mg/l-es (a levegőtelítettség > 40 %) szinten kell tartani. A víz hőmérsékletét, pH-ját és az oldott oxigén koncentrációját legalább hetente kell mérni; a hőmérsékletet ajánlott legalább egy vizsgálati edényben folyamatosan mérni. Az 1. függelék ismerteti azokat a vizsgálati feltételeket, amelyek mellett a protokollt végre kell hajtani. Az átfolyásos expozíciós rendszerek és/vagy a statikus megújítási rendszerek felállítására vonatkozó további információkért olvassa el az ASTM „Vizsgálati anyagok akut toxicitási vizsgálata halakon, makroszkopikus gerincteleneken és kétéltűeken” című standard útmutatóját (5) és az általános vízi toxikológiai vizsgálatok leírását.

Vízminőség

8. Bármely olyan helyben elérhető víz (pl. forrásvíz vagy faszénen szűrt csapvíz) használható, amelyben az *X. laevis* ebihalak normálisan növekednek és fejlődnek. Mivel a helyi vízminőség területenként lényegesen eltérhet, a víz minőségét elemezni kell, különösen ha nem állnak rendelkezésre korábbi adatok a víz *Xenopus* fajok tenyésztésére való alkalmasságáról. Különös figyelmet kell fordítani arra, hogy a víz réztől, klórtól és klóraminoktól mentes legyen, mivel ezek mindegyike mérgező a békák és ebihalak számára. Ajánlott továbbá megmérni a vízben a fluorid, a perklorát és a klorát háttérkoncentrációját (az ivóvíz-fertőtlenítés melléktermékei), mivel az összes ilyen anion a pajzsmirigy jódtranszporterének

▼M6

szubsztrátuma, és magas szintjük zavarhatja a vizsgálat eredményét. Az elemzést a vizsgálat megkezdése előtt kell elvégezni, és a vizsgálati víznek rendes körülmények között mentesek kell lennie ezektől az ionoktól.

A vizsgálati víz jodidkoncentrációja

9. Annak érdekében, hogy a pajzsmirigy hormonokat tudjon szintetizálni, elegendő jodidnak kell elérhetőnek lennie a lárvák számára a vízben és a táplálékforrásokban. A minimális jodidkoncentráció tekintetében jelenleg nem állnak rendelkezésre empirikus iránymutatások. A jodid elérhetősége hatással lehet a pajzsmirigynek a pajzsmirigyre ható anyagokkal szembeni válaszkészségére, és ismert az is, hogy a jodid módosítja a pajzsmirigy alapaktivitását, ami egy olyan szempont, amelyet figyelembe kell venni a pajzsmirigy kórszövettani eredményeinek értelmezésénél. Ezért a vizsgálati vízben mért jodidkoncentrációt a jegyzőkönyvben meg kell adni. A validálási vizsgálatokból nyert adatok alapján a protokoll bizonyítottan jól működik, ha a vizsgálati víz jodid- (I^-) koncentrációja 0,5 és 10 μg/l között van. Ideális esetben a vizsgálati víz jodidkoncentrációja legalább 0,5 μg/l. Ha a vizsgálati víz ioncserélt vízből mesterségesen készített víz, legalább 0,5 μg/l koncentrációban jódot kell hozzáadni. A vizsgálati víz jóddal vagy más sóval történő bármilyen további kiegészítését fel kell tüntetni a jegyzőkönyvben.

Az állatok tartása

A felnőtt állatok gondozása és tenyésztése

10. A felnőtt állatokat szabványos iránymutatások szerint kell gondozni és tenyészteni; részletesebb információkért lásd a békaembrió teratogenezis vizsgálat (FETAX) szabványos útmutatóját (6). E szabványos iránymutatások példaként szolgálnak a megfelelő gondozási és tenyésztési módszerek tekintetében, de szigorú betartásuk nem kötelező. A párosodás kiváltása érdekében a felnőtt nőstény és hím párokat (3–5) humán koriogonadotropinnal (HCG-vel) oltjuk be. A nőstény példányokba körülbelül 800–1 000 NE, a hím példányokba körülbelül 600–800 NE 0,6–0,9 %-os sóoldatban feloldott HCG-t injektálunk. A tenyészpárokat az amplexus elősegítése érdekében nagy tartályokban, zavartalan, statikus körülmények között tartjuk. A tenyésztőtartályok alján rozsdamentes acél vagy műanyag hálóból készült álfenéknek kell lennie, amely lehetővé teszi, hogy a petecsomók a tartály aljára essenek. A késő délután beinjekciózott békák a petéik többségét általában a következő nap délelőttjére rakják le. Miután elegendő mennyiségű petét raktak le és termékenyítettek meg, a felnőtt példányokat el kell távolítani a tenyésztőtartályokból.

A lárvák gondozása és kiválasztása

11. Miután a felnőtt példányokat eltávolítottuk a tenyésztőtartályokból, összegyűjtjük a petéket és – a tenyésztőtartályokból vett embriók egy kisebb, reprezentatív csoportjának segítségével – értékeljük az életképességüket. Az embriók életképessége és a megfelelő számú (minimum 1 500) embrió megléte alapján a legjobbnak minősített petecsomót (csomókat) (a csomók minőségének értékeléséhez 2–3 csomó ajánlott) kell megőrizni. A vizsgálatban használt organizmusoknak ugyanabból a peterakási eseményből kell származniuk (azaz a petecsomókat nem lehet összekeverni). Az embriókat egy nagy lapos serpenyőbe vagy edénybe helyezzük át, és a nyilvánvalóan elpusztult vagy kóros elváltozást mutató petéket (a fogalom

▼M6

meghatározását lásd az (5) pontban) pipettával vagy szemcseppentővel eltávolítjuk. A három petecsomóból származó egészséges embriókat három különálló keltetőtartályba helyezzük át. A keltetőtartályokba történő áthelyezés után négy nappal az életképesség és a kikelés sikeressége alapján kiválasztjuk a legjobb petecsomót, és a lárvákat megfelelő számú, 22 ± 1 °C hőmérsékletű nevelőtartályba helyezzük át. Ezenkívül további lárvákat helyezünk át külön tartályokba, amelyekkel pótoljuk az első héten esetlegesen elhullott egyedeket a nevelőtartályokban. Ezzel az eljárással fenntartható az állandó egyedsűrűség, és ezáltal csökkenthetők a fejlődési eltérések az egy csomóból származó állományon belül. A nevelőtartályokat a víz kiszivattyúzásával naponta tisztítsuk. Elővigyázatosságból latexkesztyű helyett lehetőleg vinil- vagy nitrilkesztyűt használjunk. Az elhullott állatokat naponta el kell távolítani és az első héten pótolni kell a lárvákat a tartályokban az egyedsűrűség fenntartása érdekében. Az állatokat legalább naponta kétszer kell etetni.

12. Az ebihalakat az expozíciót megelőző fázisban hozzá kell szoktatni a tényleges expozíció szakaszában fennálló feltételekhez, beleértve a táplálék típusát, a hőmérsékletet, a világos és sötét időszakok váltakozását és a tenyésztőközeget. Ezért az expozíció előtti fázisban és az expozíciós fázisban ugyanazt a tenyésztő-/hígítóvizet ajánlott használni. Ha az ebihalak tartására az expozíció előtti fázisban statikus tenyésztési rendszert használunk, a tenyésztőközeget legalább hetente kétszer teljesen ki kell cserélni. Az expozíciót megelőző időszakban el kell kerülni a magas lárvasűrűség okozta zsúfoltságot, mert az ilyen hatások jelentősen befolyásolhatják az ebihalak fejlődését a következő vizsgálati fázisban. Ezért a nevelési sűrűség nem haladhatja meg a körülbelül négy ebihal/l tenyésztőközeg (statikus expozíciós rendszer esetén) vagy a 10 ebihal/l tenyésztőközeg értéket (például 50 ml/perc áramlási sebesség mellett az expozíció előtti vagy a tenyésztőrendszerben). Ilyen körülmények között az ebihalaknak a 45/46. stádiumból tizenkét napon belül tovább kell fejlődniük az 51. stádiumba. Az expozíció megfelelő kezdő időpontjának meghatározása érdekében naponta meg kell vizsgálni a törzsállományból kiválasztott reprezentatív ebihalak fejlődési stádiumát. Gondoskodni kell róla, hogy az ebihalakat a lehető legkisebb stressz és trauma érje, különösen az akváriumok mozgatása és takarítása, valamint a lárvák kezelése közben. Kerülni kell a stresszhatást kiváltó körülményeket/tevékenységeket, mint például a hangos és/vagy szakadatlan zajt, az akváriumok kopogtatását, az akváriumokban okozott rezgést, a túlzott laboratóriumi aktivitást, és a környezeti elemek (fényes időszakok, hőmérséklet, pH, oldott oxigénkoncentráció, a víz áramlási sebessége stb.) gyors változását. Ha az ebihalak a megtermékenyítést követő 17 napon belül nem érik el az 51. stádiumot, a túlzott stresszt kell potenciális oknak tekinteni.

A lárvák tenyésztése és táplálása

13. Az ebihalakat pl. a validálási vizsgálatok során használt kereskedelmi forgalomban kapható ebihaltáppal kell etetni (lásd az 1. függeléket) az expozíciót megelőző teljes időszakban (a Nieuwkoop és Faber (NF) szerinti 45/46. stádiumban (8)), illetve a 21 napos vizsgálati időszak teljes időtartama alatt, vagy olyan egyéb táplálékkal, amelyről kimutatták, hogy alkalmazása mellett a kétéltű-átalakulási vizsgálat azonos eredménnyel végezhető el. Az expozíciót megelőző időszakban az etetés rendjét körültekintően kell kialakítani, hogy az megfeleljen a fejlődő ebihalak igényeinek. Ez azt jelenti, hogy a frissen kikelt ebihalaknak naponta több alkalommal (legalább kétszer) kis adag táplálékot kell biztosítani. Kerülni kell a túlzott mennyiségű táplálékot i) a vízminőség fenntartása és ii) a kopoltyúlemezek táplálékrészecskékkel és törmelékkel való eltömődésének megelőzése érdekében. A validálási vizsgálatok során használt ebihaltáp esetében a napi fejadagot az ebihalak növekedésével párhuzamosan növelni kell, amíg az röviddel a vizsgálat megkezdése előtt el nem éri a mintegy 30 mg/állat/nap értéket. Erről a kereskedelmi forgalomban kapható tápról a validálási vizsgálatok kimutatták, hogy elősegíti az *X. laevis* ebihalak megfelelő növekedését és fejlődését, valamint finom por állagú, amelynek következtében

▼M6

hosszú ideig lebeg a vízoszlopban, illetve a vízáramlás kimossa. Ezért a teljes napi táplálékmennyiséget kisebb részekre kell osztani, és az állatokat legalább naponta kétszer kell etetni. A tápra vonatkozó etetési rendet az 1. táblázat mutatja be. Az etetés gyakoriságát fel kell jegyezni. A tápot szárazon vagy hígítóvízzel készített törzsoldatként lehet adagolni. Minden második nap friss törzsoldatot kell elkészíteni, és azt használaton kívül 4 °C-on kell tárolni.

1. táblázat

***X. laevis* ebihalak kereskedelmi forgalomban kapható, a validálási vizsgálatok során használt ebihaltáppal való etetésének rendje az AMA élő állatokon végzett szakasza során, átfolyásos feltételek mellett**

Vizsgálati nap	Fejadag (mg táp/állat/nap)
0–4	30
5-7	40
8-10	50
11-14	70
15-21	80

Analitikai kémia

14. A vizsgálat elvégzése előtt a vizsgált vegyi anyag oldhatóságára, lebomlására és illékonyságára vonatkozó meglévő információk alapján értékelni kell az anyag stabilitását. A vizsgálat kezdetén (0. nap), majd a vizsgálat során hetente legalább négy oldatmintát kell venni minden egyes koncentráció esetében minden egyes párhuzamos tartályából analitikai kémiai elemzés céljára. A rendszer működésének ellenőrzése céljából javasolt minden vizsgálati koncentrációt a vizsgálat megkezdése előtt, a rendszer előkészítése során is analizálni. Ezenkívül ajánlott a törzsoldatokat cseréjük esetén is elemezni, különösen akkor, ha a törzsoldat térfogata nem biztosít elegendő mennyiségű vegyi anyagot a rutinszerű mintavételi periódusok teljes időtartamának áthidalására. Olyan vegyi anyagok esetében, amelyeket a vizsgálatban használt néhány vagy egyetlen koncentrációban sem lehet kimutatni, a névleges koncentrációk kiszámítása érdekében a törzsoldatokat le kell mérni és fel kell jegyezni a rendszer áramlási sebességét.

A vegyi anyag bejuttatása

15. A vizsgált vegyi anyag rendszerbe történő bejuttatására alkalmazott módszer a vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól függően változhat. A vízben oldódó vegyi anyagokat fel lehet oldani a vizsgálati víz alikvot részeiben olyan koncentrációban, amely lehetővé teszi a vegyi anyag kívánt vizsgálati koncentrációban történő bejuttatását az átfolyásos rendszerbe. A szobahőmérsékleten folyékony és vízben rosszul oldódó vegyi anyagokat folyadék:folyadék telítési módszerek segítségével lehet bejuttatni. A szobahőmérsékleten szilárd és vízben rosszul oldódó vegyi anyagokat üveggyapot oszlopszaturátorok használatával lehet bejuttatni (7). Előnyben kell részesíteni a hordozómentes vizsgálati rendszereket; a különböző vizsgált vegyi anyagok azonban változatos fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, ami valószínűleg eltérő megközelítést igényel a vegyi anyagoknak való expozíciót szolgáló víz elkészítése során. Az oldószereket vagy hordozókat előnyös elkerülni, mivel: *i)* bizonyos oldószerek

▼M6

maguk is toxicitást és/vagy nem kívánatos vagy nem várt endokrinológiai válaszokat idézhetnek elő, *ii)* a vegyi anyagoknak a vízoldhatóságuk határán túli vizsgálata (ami gyakran előfordul oldószerek használata esetén) a hatásos koncentráció pontatlan meghatározását eredményezheti, és *iii)* hosszabb távú vizsgálatok során az oldószerek használata jelentős mértékű „biofilmképződést” eredményezhet, amely a mikrobiális tevékenységgel jár együtt. A nehezen vizsgálható vegyi anyagoknál legvégső esetben oldószert lehet alkalmazni, és a legjobb módszer meghatározása érdekében tanulmányozni kell „A nehezen vizsgálható anyagok és keverékek vízi toxikológiai vizsgálata” című OECD-iránymutatást (4). A megfelelő oldószert a vegyi anyag tulajdonságai határozzák meg. A vízi toxikológiai vizsgálatok céljára alkalmasnak talált oldószerek közé tartozik az aceton, az etanol, a metanol, a dimetil-formamid és a trietilénglikol. Ha oldószerhordozót használunk, az oldószer koncentrációjának a krónikus megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) alatt kell lennie; az OECD-iránymutatás legfeljebb 100 µl/l koncentrációt javasol; egy közelmúltban megjelent tanulmány azonban 20 µl/l hígítóvíz oldószerkoncentrációt javasol (12). Ha oldószerhordozót használunk, a nem oldószeres kontrollok (tiszta víz) mellett a megfelelő oldószeres kontrollokat is értékelni kell. Ha a vegyi anyagot fizikai-kémiai jellemzői (alacsony oldhatóság) vagy korlátozott kémiai elérhetősége miatt nem lehet vízen keresztül bejuttatni, mérlegelni lehet a táplálékon keresztüli bevitelt. A táplálékon keresztüli expozícióval kapcsolatban előzetes vizsgálatokat már végeztek, de ezt az expozíciós útvonalat nem használják széles körben. A módszer kiválasztását dokumentálni és analitikusan ellenőrizni kell.

A vizsgálati koncentrációk kiválasztása

A vizsgálati koncentráció felső határértékének meghatározása

16. A vizsgálati koncentráció felső határértékét e vizsgálat esetében a vizsgált vegyi anyag oldhatósági határával, vagy – akut mérgező hatású vegyi anyagok esetében – a legnagyobb tolerálható koncentrációval (maximum tolerated concentration, MTC) megegyező értékben, vagy 100 mg/l értékben kell megállapítani, aszerint, hogy ezek közül melyik a legalacsonyabb.

17. Az MTC a vegyi anyag azon legnagyobb vizsgálati koncentrációja, amely kevesebb mint 10 % akut mortalitást eredményez. E megközelítés használatának előfeltétele, hogy rendelkezésre álljanak olyan empirikus akut mortalitási adatok, amelyekből az MTC-t meg lehet becsülni. Az MTC becslése azonban pontatlan lehet, és jellemzően egyéni szakmai megítélés alapján kell róla dönteni. Bár az MTC becslésére a regressziós modellek használata tűnik a szakmailag legmegalapozottabb módszernek, a meglévő akut adatokból is használható becsült MTC érték vezethető le, az akut LC_{50}-érték 1/3-ának alkalmazásával. Előfordulhat azonban, hogy a vizsgálathoz használt faj esetében nem állnak rendelkezésre akut toxicitási adatok. Ha fajspecifikus akut toxicitási adatok nem állnak rendelkezésre, akkor 96 órás LC_{50}-vizsgálatot lehet végezni olyan ebihalakkal, amelyek reprezentatívak az AMA vizsgálathoz használt ebihalak szempontjából (azaz ugyanabban a fejlődési stádiumban vannak). Ha más vízi fajokra vonatkozó adatok rendelkezésre állnak (például halakra vagy más kétéltűekre vonatkozó LC_{50}-vizsgálatokból), akkor fajok közötti extrapoláció révén, szakmai megítélés alapján is megbecsülhető a várható MTC.

18. Alternatív megoldásként, ha a vegyi anyag nem fejt ki akut toxikus hatást és 100 mg/l felett oldható, akkor a 100 mg/l értéket kell a vizsgálati koncentráció felső határának tekinteni, mivel ez a koncentráció általában „gyakorlatilag nem mérgezőnek” tekinthető.

▼M6

19. Bár nem ez a javasolt eljárás, statikus megújítási módszereket is lehet használni, ha az átfolyásos módszerekkel nem lehet az MTC-t elérni. Ha statikus megújítási módszereket alkalmazunk, a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának stabilitását dokumentálni kell, és annak a működési követelmények szabta korlátokon belül kell maradnia. Huszonnégy órás megújítási időszakok használata ajánlott. A 72 órát meghaladó megújítási időszakok használata nem megengedett. Továbbá az egyes megújítási időszakok végén, közvetlenül a vízcsere előtt meg kell mérni a víz minőségi paramétereit (pl. oldott oxigénkoncentráció, hőmérséklet, pH stb.).

Vizsgálati koncentrációtartomány

20. *Minimum* három vizsgálati koncentráció, valamint egy tiszta vizes kontroll (és adott esetben egy hordozókontroll) szükséges. A legmagasabb és a legalacsonyabb vizsgálati koncentráció közötti minimális különbségnek körülbelül egy nagyságrendnek kell lennie. A dózisok közötti maximális távolság 0,1, a minimális távolság pedig 0,33.

ELJÁRÁS

A vizsgálat megkezdése és lefolytatása

0. nap

21. Az expozíciót akkor kell elkezdeni, ha az expozíció előtti szakaszban kialakított törzspopulációban elegendő számú ebihal érte el a Nieuwkoop és Faber szerinti 51. fejlődési stádiumot (8) és koruk a megtermékenyítéstől számított legfeljebb 17 nap. A vizsgálathoz használandó állatok kiválasztásához a törzspopulációból egészséges és normális kinézetű ebihalakat kell összegyűjteni egy megfelelő mennyiségű hígítóvizet tartalmazó edénybe. A fejlődési stádium meghatározása céljából az ebihalakat egyenként el kell távolítani a gyűjtőtartályból egy kis háló vagy szűrő segítségével, és egy hígítóvizet tartalmazó átlátszó mérőkamrába (pl. 100 mm-es Petri-csészébe) kell áthelyezni őket. Előnyös, ha a stádium meghatározásához nem használunk érzéstelenítést; a kezelés előtt azonban lehet egyenként érzéstelenníteni az ebihalakat nátrium-hidrogén-karbonáttal megfelelően pufferolt (pH = 7,0) 100 mg/l trikain-metán-szulfonáttal (például MS-222). Ha érzéstelenítést használunk, akkor pl. az MS-222 megfelelő alkalmazásának módszertanát ebben járatos laboratóriumoktól be kell szerezni és a vizsgálat eredményeivel együtt jegyzőkönyvezni kell. Az állatokat az áthelyezés során óvatosan kell kezelni a kezeléssel járó stressz minimalizálása és a sérülések elkerülése érdekében.

22. Az állatok fejlődési stádiumát binokuláris preparálómikroszkóp segítségével határozzuk meg. A fejlődési stádium variabilitásának csökkentése érdekében fontos, hogy az osztályozás a lehető legpontosabban történjen. Nieuwkoop és Faber szerint (8) az 51. stádiumban lévő organizmusok kiválasztásának alapul szolgáló elsődleges fejlődési mérföldkő a hátsó végtagok morfológiája. A hátsó végtagok morfológiai jellemzőit mikroszkóp alatt kell megvizsgálni. Míg az ebihalak osztályozásával kapcsolatos részletes információkért a teljes Nieuwkoop és Faber útmutatót (8) tanulmányozni kell, a fejlődési stádiumot a hangsúlyos morfológiai jellemzők alapján is megbízhatóan el lehet dönteni. A vizsgálat során – normális egyedfejlődést feltételezve – az alábbi táblázat használható a fejlődési stádium meghatározásának egyszerűsítésére és egységesítésére a különböző stádiumokhoz kapcsolódó hangsúlyos morfológiai jellemzők azonosítása útján.

▼M6

2. táblázat

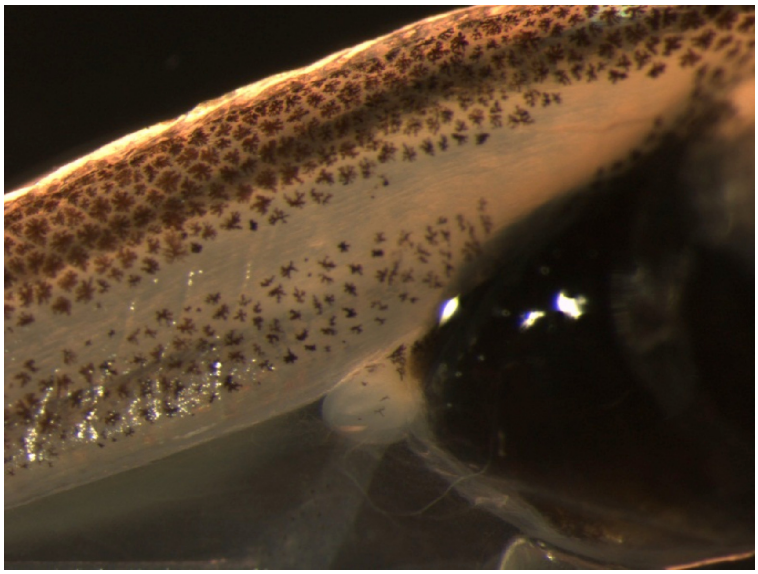
A fejlődési stádium meghatározásához használt jelentős morfológiai jellemzők Neuwkoop és Faber útmutatása alapján.

Jelentős morfológiai jellemzők	Fejlődési stádium															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Hátsó végtagok	X	X	X	X	X	X	X									
Mellső végtagok						X	X	X	X	X						
Craniofaciális szerkezet										X	X	X	X			
Szaglóideg morfológiája											X	X	X			
Farok hossza													X	X	X	X

23. A vizsgálat megkezdéséhez minden ebihalnak az 51. stádiumban kell lennie. Ebben a stádiumban a legjelentősebb stádiumot meghatározó morfológiai jellemző a hátsó végtagok morfológia, amelyet az 1. ábra mutat be.

1. ábra

A hátsó végtagok morfológiája az 51. stádiumban lévő *X. laevis* ebihalaknál.



24. A fejlődési stádium szerinti kiválasztás mellett a kísérleti állatok választhatóan méret szerint is válogathatóak. Ebből a célból egy körülbelül 20 db, Nieuwkoop és Faber szerinti 51. stádiumban lévő ebihalból álló kisebb mintán a 0. napon meg kell mérni a teljes testhosszt (és nem a farok nélküli testhosszt). A mintában lévő állatok átlagos teljes testhosszának kiszámítása után meghatározható a kísérleti állatok teljes testhosszának alsó és felső határértéke, amelyeknek az átlagérték ± 3 mm-es tartományon belül kell elhelyezkedniük (az 51. stádiumban lévő ebihalak teljes testhosszának átlagértéke 24,0 és 28,1 mm között ingadozik). Az egyes kísérleti állatok alkalmasságának meghatározása szempontjából azonban az elsődleges paraméter a fejlődési stádium. A szemmel jól látható rendellenességeket vagy sérüléseket mutató ebihalakat ki kell zárni a vizsgálatból.

▼M6

25. A fenti stádiummeghatározási kritériumoknak megfelelő ebihalakat tiszta tenyésztővízzel töltött tartályban tartjuk, amíg a stádiummeghatározó vizsgálat befejeződik. A stádiummeghatározás befejezése után a lárvákat véletlenszerűen szétosztjuk az expozíciós kezelési tartályok között, úgy, hogy minden egyes tartály 20 lárvát tartalmazzon. Ezután ellenőrizzük, hogy az egyes kezelési tartályokban nincsenek-e rendellenes megjelenésű állatok (pl. sérülések, abnormális úszóviselkedés stb.). Az egyértelműen egészségtelen megjelenésű ebihalakat a kezelési tartályokból el kell távolítani, és a helyükre a gyűjtőtartályból újonnan kiválasztott lárvákat kell helyezni.

Megfigyelések

26. A vizsgálat befejezésének módjára és az ebihalak feldolgozására vonatkozó további részletes információkért olvassa el „A kétéltűek pajzsmirigyszövettana” című OECD-iránymutatást (9).

Mérések a 7. napon

27. A 7. napon ismétlésenként öt véletlenszerűen kiválasztott ebihalat távolítunk el az egyes vizsgálati tartályokból. Az alkalmazott véletlenszerű eljárásnak biztosítania kell, hogy minden vizsgálatban részt vevő szervezet egyenlő valószínűséggel legyen kiválasztható. Ez bármely randomizálási eljárással elérhető, feltéve, hogy minden esetben hálóba fogjuk az összes ebihalat. A ki nem választott ebihalak visszakerülnek az eredeti tartályukba, a kiválasztott ebihalakat pedig pl. 150–200 mg/l MS-222 oldatban humánusan elaltatjuk, amelyet a pH = 7,0 eléréséhez nátrium-hidrogénkarbonáttal megfelelően pufferoltunk. A leölt ebihalakat vízzel leöblítjük és szárazra töröljük, majd testtömegüket a legközelebbi milligrammra kerekítve meghatározzuk. Meghatározzuk az egyes ebihalak hátsó végtagjának hosszát, farok nélküli testhosszát és fejlődési stádiumát (binokuláris preparálómikroszkóp segítségével).

Mérések a 21. napon (a vizsgálat befejezése)

28. A vizsgálat befejezésekor (21. nap) a maradék ebihalakat eltávolítjuk a vizsgálati tartályokból és pl. 150–200 mg/l MS-222 oldatban humánus módon elaltatjuk, amelyet nátrium-hidrogén-karbonáttal a fentiek szerint megfelelően pufferoltunk. Az ebihalakat vízzel leöblítjük és szárazra töröljük, majd a testtömegüket a legközelebbi milligrammra kerekítve meghatározzuk. Miden ebihal esetében megmérjük a fejlődési stádiumot, a farok nélküli testhosszt és a hátsó végtagok hosszát.

29. Az egész testes mintaként vagy az alsó állkapcsot tartalmazó vágott fejszövet-mintaként felhasznált lárvákat szövettani vizsgálatok céljára 48–72 órára Davidson-féle fixálókeverékbe helyezzük. Kórszövettani vizsgálat céljára összesen öt-öt ebihalat kell kivenni az egyes párhuzamos tartályokból. Mivel a follicularis sejtek magassága a fejlődési stádiumtól függ (10), a szövettani elemzés céljára leginkább megfelelő mintavételi megközelítés az, ha lehetőség szerint azonos stádiumban lévő példányokat használunk. Az azonos stádiumú példányok kiválasztása érdekében a lárvák fejlődési stádiumát a kiválasztás és az azt követő – az adatgyűjtés és megőrzés céljából végzett – feldolgozás előtt kell meghatározni. Erre azért van szükség, mert a fejlődésben megfigyelhető szokásos eltérések különböző stádiumeloszlást eredményeznek az egyes párhuzamos tartályokban.

30. A kórszövettanra kiválasztott állatoknak (n=5 minden párhuzamos tartályból) a kontrollok (az összes párhuzamos tartály) átlagos stádiumához kell igazodniuk. Ha vannak olyan párhuzamos tartályok, amelyekben több mint öt megfelelő stádiumban lévő lárva található, akkor azok közül öt lárvát véletlenszerűen kell kiválasztani.

▼M6

31. Ha vannak olyan párhuzamos tartályok, amelyekben kevesebb mint öt megfelelő stádiumban lévő lárva van, akkor eggyel korábbi vagy eggyel későbbi fejlődési stádiumban lévő példányokat kell véletlenszerűen kiválasztani, hogy elérjük a párhuzamos tartályonként öt lárvából álló teljes mintaméretet. Azt, hogy eggyel korábbi vagy eggyel későbbi stádiumban lévő lárvákat választunk-e ki a mintához, lehetőleg a kontrollcsoportok stádiumeloszlása és a kezeléshez használt vegyi anyag átfogó értékelése alapján kell eldönteni. Azaz ha a vegyi anyaggal történő kezelés a fejlődésben való visszamaradással jár, a további lárvákat az eggyel korábbi fejlődési stádiumból kell kiválasztani a mintavétel során. Ezzel ellentétben ha a vegyi anyaggal történő kezeléshez a fejlődés felgyorsulása társul, akkor a további lárvákat az eggyel későbbi fejlődési stádiumból kell kiválasztani.

32. Elképzelhető, hogy a vizsgált vegyi anyaggal történő kezelés az ebihalak fejlődésében olyan súlyos elváltozást okoz, hogy nem lesz átfedés a vegyi anyaggal kezelt csoportok stádiumeloszlása és a kontroll számított átlagos fejlődési stádium között. Kizárólag ezekben az esetekben a kiválasztási folyamat módosítható, és a kontroll átlagos fejlődési stádiumától eltérő fejlődési stádium használható annak érdekben, hogy fejlődési stádium szerint összeillő lárvákat lehessen vételezni a pajzsmirigy kórszövettani vizsgálata céljára. Továbbá ha a stádiumok határozatlanok (azaz aszinkrónia áll fenn), akkor az egyes párhuzamos tartályokból véletlenszerűen kell 5 ebihalat a szövettani elemzéshez kiválasztani. A jegyzőkönyvben meg kell indokolni bármely, a kontroll átlagos stádiumától eltérő fejlődési stádiumban lévő lárva kiválasztását a mintavétel során.

A biológiai végpontok meghatározása

33. Az elsődleges végpontok mérését a 21 napos expozíciós fázisban a 7. és a 21. napon végezzük, de szükséges a vizsgálati állatok napi megfigyelése is. A 3. táblázat áttekintést nyújt a mérési végpontokról és az azokhoz tartozó megfigyelési időpontokról. A apikális végpontok méréséről és a szövettani vizsgálatok céljára szolgáló technikai eljárásokról további részletes információ az OECD-iránymutatásokban található (9).

3. táblázat

Az elsődleges végpontok megfigyelési időpontjai az AMA vizsgálatban.

Apikális végpontok	Naponta	7. nap	21. nap
— Mortalitás	•		
— Fejlődési stádium		•	•
— Hátsó végtagok hossza		•	•
— Farok nélküli testhossz		•	•
— Nedves testtömeg		•	•
— Pajzsmirigyszövettan			•

▼M6

Apikális végpontok

34. Az AMA apikális végpontjai a fejlődési stádium, a hátsó végtagok hossza, a farok nélküli testhossz és a nedves testtömeg. Az alábbiakban röviden mindegyik bemutatásra kerül. Ezen adatok gyűjtéséről a hivatkozott iránymutatásokban további technikai információk állnak rendelkezésre, beleértve az ajánlott számítógéppel támogatott elemzési eljárásokat is.

Fejlődési stádium

35. Az *X. laevis* ebihalak fejlődési stádiumát Nieuwkoop és Faber stádium-meghatározási kritériumai segítségével határozzuk meg (8). A fejlődési stádiumra vonatkozó adatok alapján megállapítjuk, hogy a fejlődés felgyorsult, aszinkron, késleltetett vagy változatlan. A fejlődés felgyorsulását vagy késleltetését úgy határozzuk meg, hogy összehasonlítjuk a kontroll- és a kezelt csoportok által elért fejlődési stádium mediánját. Aszinkron fejlődésről akkor lehet beszámolni, ha a vizsgált szövetek nem hibásak vagy rendellenesek, de a különböző szövetek morfogenezisének vagy fejlődésének egymáshoz viszonyított időzítése egy ebihalon belül megbomlik.

A hátsó végtagok hossza

36. A hátsó végtagok differenciálódását és növekedését a pajzsmirigyhormonok szabályozzák, és olyan jelentős fejlődési mérföldkőnek számít, amelyet már a fejlődési stádium meghatározása során is alkalmaztunk. A hátsó végtagok fejlődését minőségi szempontként használjuk a fejlődési stádium meghatározásakor, de itt mennyiségi végpontnak tekintjük. Ezért a hátsó végtagok hosszát a pajzsmirigytengelyre gyakorolt hatás kimutatására szolgáló végpontként mérjük (2. ábra). A következetesség érdekében a hátsó végtagok hosszát a bal hátsó végtagon mérjük. A hátsó végtagok hosszát a vizsgálat 7. és 21. napján értékeljük. A hátsó végtagok hosszának a 7. napon történő mérése egyszerű, amint az a 2. ábrán is látható. A hátsó végtagok hosszának a 21. napon történő mérése azonban a végtagban lévő hajlatok miatt bonyolultabb. Ezért a hátsó végtagok hosszának a 21. napon történő mérését a test falánál kezdjük, és szögeltérések esetén is végig a végtag középvonalát követjük. A hátsó végtagok hosszának 7. napon megfigyelhető eltéréseit – akkor is, ha a 21. napon nem nyilvánvalóak – szignifikánsnak kell tekinteni a potenciális pajzsmirigy-aktivitás szempontjából. A hosszméréseket digitális fényképeken, képelemző szoftver segítségével végezzük „A kétéltűek pajzsmirigy-szövettana” című OECD-iránymutatásban leírtak szerint (9).

Testhossz és nedves tömeg

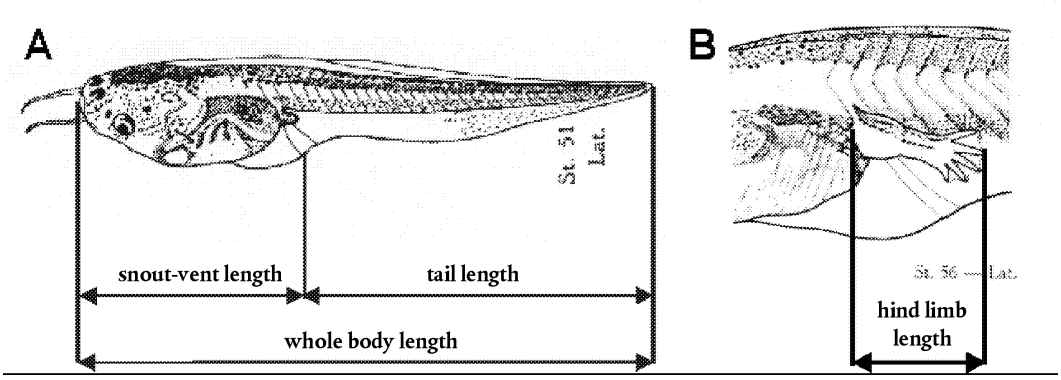
37. A farok nélküli testhossz (2. ábra) és a nedves tömeg meghatározása a vizsgált vegyi anyagoknak az ebihalak – kontrollcsoporttal összehasonlított – növekedési ütemére gyakorolt lehetséges hatásainak értékelése céljából szerepel a vizsgálati protokollban, és hasznos a vizsgált vegyi anyag általános toxicitásának kimutatásában is. Mivel a rátapadó víz eltávolítása a testtömeg meghatározása érdekében stresszt okozhat az ebihalaknak, illetve bőrkárosodást is előidézhet, ezeket a méréseket csak az ebihalak a 7. napon kiválasztott kisebb mintáján végezzük el, a többi ebihalon pedig csak a vizsgálati befejezésekor (21. nap). A következetesség kedvéért a végbélnyílás cranialis vége legyen a mérés caudalis határa.

38. A farok nélküli testhosszt az ebihalak növekedésének 2. ábra szerinti értékeléséhez használjuk.

▼M6

2. ábra

(A) A testhossz mérésének típusai és (B) Az *X. laevis* ebihalak hátsó végtagja hosszának mérése (1).



Pajzsmirigyszövettan

39. Míg a fejlődési stádium és a hátsó végtagok hossza fontos végpont az átalakulásos fejlődés expozícióval összefüggő változásainak értékelésében, a fejlődésben jelentkező késedelem önmagában nem tekinthető a pajzsmirigyműködést gátló aktivitás diagnosztikai indikátorának. Egyes változások csak rutin kórszövettani vizsgálattal figyelhetők meg. A diagnosztikai kritériumok között szerepel a pajzsmirigy hypertrophia/atrophia, a follikuláris sejthypertrophia, a follikuláris sejthyperplasia, illetve további minőségi kritériumként a follikuláris lumen területe, a kolloid minősége és a follikuláris sejtek magassága/alakja. A súlyossági fokot (4 fokozat) jegyzőkönyvezni kell. A szövettani elemzés céljára történő mintavételre és a minták feldolgozására, valamint a szövetminták szövettani elemzésére vonatkozó információk a következő kiadványban találhatók: „Kétéltű-átalakulási vizsgálat: 1. rész – A morfológiai mintavételre és szövettani feldolgozásra vonatkozó technikai iránymutatás” és „Kétéltű-átalakulási vizsgálat: 2. rész – A vizsgálatok, a diagnosztikai kritériumok, a súlyossági besorolás és az atlasz értelmezésére vonatkozó megközelítés” (9). A vizsgálatot első alkalommal végző laboratóriumoknak a pajzsmirigy szövettani elemzése és értékelése előtt képzési célból tanácsot kell kérniük tapasztalt kórboncnokoktól. Az apikális végpontoknak a fejlődés felgyorsulását vagy aszinkrónián jelző egyértelmű és jelentős változásai feleslegessé tehetik a pajzsmirigy kórszövettani elemzését. Ugyanakkor a nyilvánvaló morfológiai elváltozások hiánya vagy a fejlődési késedelemre utaló bizonyíték indokolttá teszi a szövettani elemzést.

Mortalitás

40. Naponta ellenőrizni kell, hogy a vizsgálati tartályokban vannak-e elpusztult ebihalak, és a kapott számot minden tartály esetében fel kell jegyezni. Minden mortalitási eseménynél fel kell jegyezni a dátumot, a koncentrációt és a tartály számát. Az elhullott állatokat észrevételüket követően azonnal el kell távolítani a vizsgálati tartályból. A 10 %-ot meghaladó mortalitási arány egyaránt jelezhet nem megfelelő vizsgálati körülményeket vagy a vizsgált vegyi anyag toxikus hatását.

További megfigyelések

41. Az abnormális viselkedést és a szabad szemmel látható fejlődési rendellenességek és elváltozások eseteit fel kell jegyezni. Bármilyen abnormális viselkedés és szabad szemmel látható fejlődési rendellenesség vagy elváltozás esetében fel kell jegyezni a dátumot, a koncentrációt és a tartály

▼M6

számát. A normális viselkedést a következők jellemzik: az ebihalak a vízoszlopban lebegnek, farkuk a fejük fölé emelkedik, a farokúszójuk egyenletesen, ritmikusan mozog, időszakonként a felszínre emelkednek, a kopoltyúfedőjük mozog, és reagálnak az ingerekre. Kóros viselkedés például ha az ebihal a víz felszínén lebeg, a tartály alján fekszik, fordítva vagy szabálytalanul úszik, nem emelkedik fel a felszínre, vagy nem reagál az ingerekre. Emellett a táplálékfogyasztásban a kezelések között mutatkozó jelentős eltéréseket is fel kell jegyezni. A jelentős fejlődési rendellenességek és elváltozások közé tartoznak többek között a morfológiai rendellenességek (pl. végtagdeformitások), a vérzéses elváltozások és a bakteriális vagy gombás fertőzések. Ezek minőségi megállapítások, amelyeket a betegségek vagy stressz okozta klinikai tünetekhez hasonlóan kell mérlegelni, és a kontrollállatokkal összehasonlításban kell megtenni. Ha a rendellenességek előfordulása vagy előfordulási aránya nagyobb az expozíciós tartályokban, mint a kontrollokban, akkor ezt a nyilvánvaló toxicitás bizonyítékának kell tekinteni.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatgyűjtés

42. Minden adatot a helyes laboratóriumi gyakorlatnak megfelelő elektronikus vagy manuális rendszerek segítségével kell összegyűjteni. A vizsgálati adatoknak az alábbiakat kell tartalmazniuk:

Vizsgált vegyi anyag:

— A vizsgált vegyi anyag jellemzése: fizikai-kémiai tulajdonságok; stabilitással és biológiai lebomlással kapcsolatos információk;

— Kémiai információk és adatok: a hígítás módja és gyakorisága. A vizsgált vegyi anyagra vonatkozó információ magában foglalja a vizsgált vegyi anyag – és bizonyos esetekben az átalakulási termék – tényleges és névleges koncentrációját. A vizsgált vegyi anyag mérésére lehet szükség a törzsoldatok, valamint a vizsgálati oldatok esetében;

— Oldószer (ha az nem víz): az oldószer kiválasztásának indoklása, az oldószer jellemzői (jelleg, alkalmazott koncentráció);

Vizsgálati feltételek:

— Operatív feljegyzések: ide kell sorolni a vizsgálati rendszer működésére, illetve a támogató környezetre és infrastruktúrára vonatkozó megfigyeléseket. Tipikus feljegyzések: környezeti hőmérséklet, vizsgálati hőmérséklet, megvilágítási időszak, az expozíciós rendszer kritikus komponenseinek állapota (pl. szivattyúk, ciklusszámlálók, nyomás), áramlási sebesség, vízszint, a törzsállomány változásai, és etetési feljegyzések. Az általános vízminőségi paraméterek a következők: pH, DO, vezetőképesség, összes jód, lúgosság és keménység;

— A vizsgálati módszertől való eltérések: a megadott információnak tartalmaznia kell a vizsgálati módszertől való eltérésekre vonatkozó minden információt, illetve azok szöveges leírását;

Eredmények:

— Biológiai megfigyelések és adatok: ide tartozik a napi mortalitás, a táplálékfogyasztás, az abnormális úszó viselkedés, a levertség, az egyensúly elvesztése, a fejlődési rendellenességek, elváltozások stb. Az előre meghatározott időközönként összegyűjtött megfigyelések és adatok a következők: fejlődési stádium, hátsó végtagok hossza, farok nélküli testhossz és nedves tömeg;

▼M6

— Statisztikai elemzési technikák és az alkalmazott technikák indoklása; a statisztikai elemzés eredményei lehetőleg táblázatos formában;

— Szövettani adatok: ide tartoznak a szöveges leírások, valamint az egyes megfigyelések súlyosságának és előfordulási gyakoriságának osztályozása a kórszövettani iránymutatásban részletezettek szerint;

— Ad hoc megfigyelések: ezek közé a megfigyelések közé tartoznak a vizsgálathoz fűzött olyan szöveges leírások, amelyek nem illenek bele az előzőleg ismertetett kategóriákba.

Adatszolgáltatás

43. A 2. függelék napi adatgyűjtési táblázatokat tartalmaz, amelyek iránymutatásként használhatóak a nyers adatok beviteléhez és az azokat összesítő statisztikai számításokhoz. Ezenkívül rendelkezésre állnak a jelentéshez használható táblázatok is, amelyek megkönnyítik a végponti adatokról készített összefoglalók közlését. A szövettani vizsgálatok jelentésére szolgáló táblázatok a 2. függelékben találhatók.

Teljesítménykritériumok és a vizsgálat elfogadhatósága/érvényessége

44. A vizsgálati módszertől való jelentős eltérés általában olyan adatokat eredményez, amelyek értelmezhetetlenek vagy a jelentés céljára alkalmatlanok. Ezért iránymutatásként kifejlesztették a 4. táblázatban található kritériumokat, amelyek az elvégzett vizsgálat minőségének és a kontrollorganizmusok általános teljesítményének meghatározására vonatkoznak.

Kritérium

Elfogadható határok

Kritérium	Elfogadható határok
Vizsgálati koncentrációk	≤ 20 % KV (a mért vizsgálati koncentráció változékonysága) értéken kell tartani a 21 napos vizsgálat alatt
Mortalitás a kontrollokban	≤ 10 % – a mortalitás egyik kontrollismétlésben sem haladhatja meg a 2 ebihalat
A kontrollok fejlődési stádiumának minimális mediánja a vizsgálat végén	57
A fejlődési stádium szórása a kontrollcsoportban	A fejlődési stádium eloszlásának 10. és 90. percentilise közötti különbség nem lehet több 4 szakasznál
Oldott oxigén	A levegőtelítettség (*) ≥ 40 %-a
pH	A pH-t 6,5–8,5 között kell tartani. Az ismétlések/kezelések közötti különbség értéke nem haladhatja meg a 0,5-öt.
Vízhőmérséklet	22 ± 1 °C – az ismétlések/kezelések közötti különbség nem haladhatja meg a 0,5 °C-ot
Vizsgálati koncentrációk nyilvánvaló toxicitás nélkül	≥ 2
Ismétlések teljesítménye	≤ 2 ismétlés lehet érvénytelen az egész vizsgálat során

▼M6

Kritérium	Elfogadható határok
Oldószer használatára vonatkozó különleges feltételek	Ha hordozó oldószert alkalmazunk, oldószeres kontrollt és tiszta vizes kontrollt is használni kell, a kapott eredményeket pedig jegyzőkönyvezni kell.
	Az oldószeres és a vizes kontrollcsoportok közötti statisztikailag szignifikáns különbségeket külön kezeljük. Lásd alább a részletes leírást.
A statikus megújítási rendszerre vonatkozó különleges feltételek	A megújítás előtti és utáni reprezentatív kémiai elemzéseket jegyzőkönyvezni kell
	Az ammónia szintjét közvetlenül a vízcsere előtt ellenőrizni kell
	Az 1. függelék 1. táblázatában felsorolt valamennyi vízminőségi paramétert közvetlenül a vízcsere előtt meg kell mérni
	A megújítási időszak nem haladhatja meg a 72 órát
	Megfelelő etetési rend (a kereskedelmi ebihaltápból álló napi fejadag 50 %-a)

(*) A víz állandó levegőztetése buborékolókkal biztosítható. A buborékolókat olyan magasságban javasolt elhelyezni, ahol nem okoznak indokolatlan stresszt az ebihalaknak.

A vizsgálat érvényessége

45. A vizsgálat elfogadhatóságához/érvényességéhez az alábbi követelményeknek kell teljesülniük:

Érvényes, a pajzsmirigyre kifejtett aktivitás szempontjából negatívnak tekintett kísérlet egy vizsgálat során:

(1) Bármely kezelés esetében (ideértve a kontrollokat is) a mortalitás nem haladhatja meg a 10 %-ot. A mortalitás egyik ismétlés esetében sem haladhatja meg a három ebihalat, ellenkező esetben az ismétlést érvénytelennek kell tekinteni

(2) Legalább két – mind a négy érvényes ismétlést bevonó – kezelési szintnek kell rendelkezésre állnia az elemzéshez

(3) Legalább két – nyilvánvaló toxicitást nem mutató – kezelési szintnek kell rendelkezésre állnia az elemzéshez

Érvényes, a pajzsmirigyre kifejtett aktivitás szempontjából pozitívnak tekintett kísérlet egy vizsgálat során:

(1) A kontrollcsoportban a mortalitás legfeljebb két ebihal/ismétlés lehet

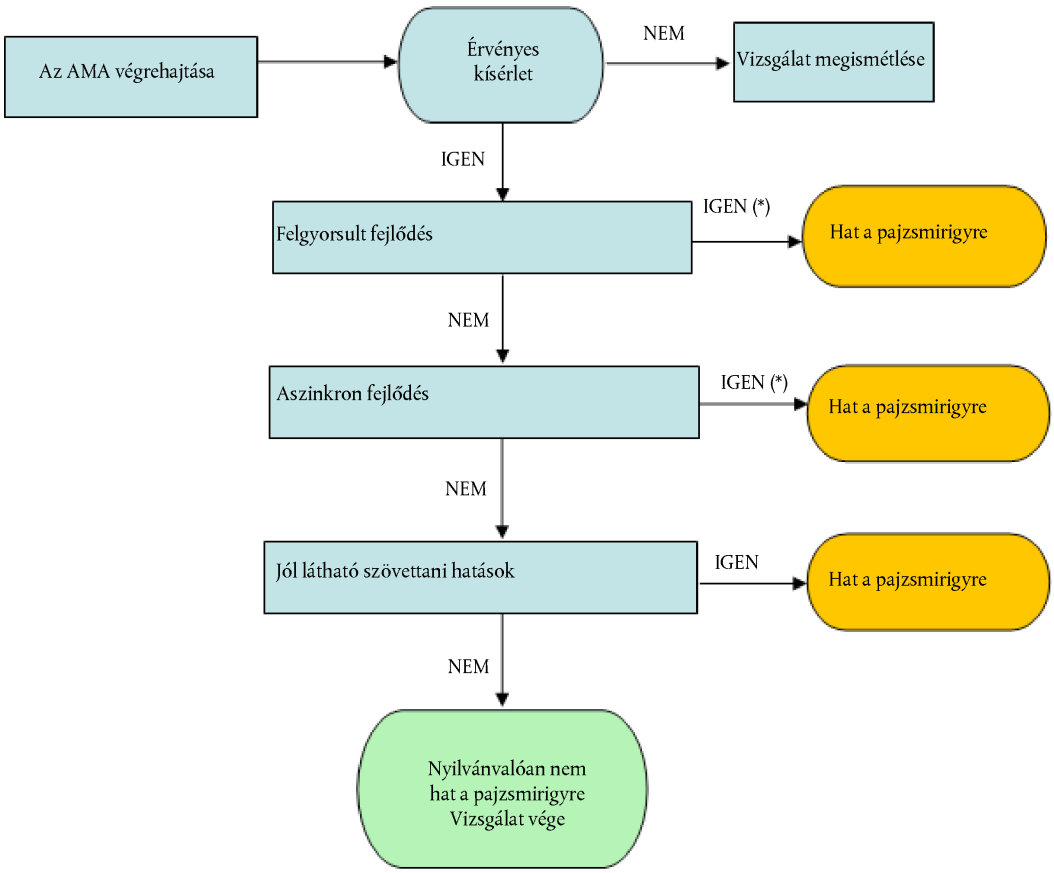
Döntési diagram az AMA végrehajtásához

46. Az AMA számára kifejlesztettek egy döntési diagramot, amely logikai segítséget nyújt a biológiai vizsgálat végrehajtásához és az eredmények értelmezéséhez (lásd a 3. ábrán látható folyamatábrát). A döntési diagram lényegében a végpontokat súlyozza: a felgyorsult fejlődés, az aszinkron fejlődés, valamint a pajzsmirigy-kórszövettan nagyobb súlyt kap, míg az általános toxicitással is befolyásolható paraméterek: a késleltetett fejlődés, a farok nélküli testhossz és a nedves testtömeg kisebb súllyal kerülnek beszámításra.

▼M6

3. ábra

Döntési diagram az AMA végrehajtásához



(*) Egyes szabályozó hatóságok annak ellenére is megkövetelhetik a szövettani vizsgálatot, hogy a felgyorsult és az aszinkron fejlődés esetében jelentős különbségek mutatkoznak. Ajánlott, hogy a vizsgálatot végző szervezet a vizsgálat elvégzése előtt egyeztesse a megfelelő hatósággal, hogy melyik végpontra van szükség

Felgyorsult fejlődés (a fejlődési stádium, az farok nélküli testhossz és a hátsó végtagok hosszának segítségével meghatározva)

47. Felgyorsult fejlődés ismereteink szerint csak olyan hatások következtében fordul elő, amelyek összefüggésben vannak a pajzsmirigyhormonokkal. Ezek lehetnek perifériás szöveti hatások, mint például a pajzsmirigyhormon-receptorral (például a T4-receptorral) való közvetlen interakció, vagy olyan hatások, amelyek megváltoztatják keringő pajzsmirigyhormonok szintjét. Mindkét eset elegendő bizonyítéknak tekinthető arra, hogy a vegyi anyag hat a pajzsmirigyre. A felgyorsult fejlődést kétféleképpen értékelhetjük. Egyrészt meghatározhatjuk az általános fejlődési stádiumot a Nieuwkoop és Faber által részletezett standard módszerrel (8). Másrészt olyan specifikus morfológiai jellemzőket lehet számszerűsíteni – például a hátsó végtagok hosszát a 7. és a 21. napon –, amelyek pozitív összefüggésben vannak a pajzsmirigyhormon-receptorra kifejtett agonista hatással. Ha statisztikailag szignifikáns előrehaladás figyelhető meg a fejlődésben vagy a hátsó végtagok hosszában, akkor a vizsgálat azt jelzi, hogy a vegyi anyag hat a pajzsmirigyre.

▼**M6**

48. A következő négy végpont statisztikai elemzése alapján értékeljük ki azt, hogy a kísérleti állatok fejlődése a kontrollcsoporthoz képest felgyorsult-e:

— hátsó végtagok hossza (a farok nélküli testhosszal normálva) a vizsgálat 7. napján

— hátsó végtagok hossza (a farok nélküli testhosszal normálva) a vizsgálat 21. napján

— fejlődési stádium a vizsgálat 7. napján

— fejlődési stádium a vizsgálat 21. napján

49. A hátsó végtagok hosszának statisztikai elemzését a bal hátsó végtag hossza alapján kell elvégezni. A hátsó végtagok hosszát az egyes egyedek hátsóvégtag-hosszának és farok nélküli testhosszának arányával normáljuk. Ezután az egyes kezelési szinteken összehasonlítjuk a normált értékek átlagát. A fejlődés felgyorsulását az jelzi, ha a hátsó végtagok hosszának a vizsgálat 7. és/vagy 21. napján számított (normált) átlaga a kontroll csoporttal összehasonlítva jelentősen megnövekszik a vegyi anyaggal kezelt csoportban (lásd a 3. mellékletet).

50. A fejlődési stádiumra vonatkozó statisztikai elemzéseket a fejlődési stádiumok Nieuwkoop és Faber által leírt morfológiai kritériumok szerinti meghatározása alapján kell elvégezni (8). A fejlődés felgyorsulását az jelzi, ha a kontrollcsoporttal összehasonlítva a multikvantális analízis a fejlődési stádium szignifikáns növekedését mutatja ki a vegyi anyaggal kezelt csoportban a vizsgálat 7. és/vagy 21. napján.

51. Az AMA vizsgálati módszerben a fentebb említett négy végpont bármelyikére kifejtett jelentős hatás elegendő a felgyorsult fejlődés kimutatására. Ennek értelmében a hátsó végtagok hosszára egy adott időpontban gyakorolt szignifikáns hatást nem kell megerősítenie sem a hátsó végtagok hosszára egy másik időpontban gyakorolt szignifikáns hatásnak, sem pedig a fejlődési stádiumra ebben az adott időpontban gyakorolt szignifikáns hatásnak. Hasonlóképp, a fejlődési stádiumra egy adott időpontban gyakorolt szignifikáns hatást sem kell megerősítenie a fejlődési stádiumra egy másik időpontban gyakorolt szignifikáns hatásnak, vagy a hátsó végtagok hosszára ebben az adott időpontban gyakorolt szignifikáns hatásnak. A felgyorsult fejlődésre vonatkozó bizonyítékok azonban meggyőzőbbek, ha több mint egy végpont esetében észlelünk szignifikáns hatást.

Aszinkron fejlődés (a stádiummeghatározási kritériumok alapján meghatározva)

52. Az aszinkron fejlődést az jellemzi, ha a különböző szövetek morfogenezisének vagy fejlődésének egymáshoz viszonyított időzítése egyetlen ebihalon belül megbomlik. Ha egy szervezet fejlődési stádiumát az egyes stádiumokat jellemző morfológiai végpontegyüttes segítségével nem lehet egyértelműen meghatározni, az azt jelzi, hogy a szövetek az átalakulás során aszinkron módon fejlődnek. Az aszinkron fejlődés a pajzsmirigyre kifejtett hatás indikátora. Az egyetlen ismert hatásmechanizmus, amely aszinkron fejlődést okoz, az a vegyi anyagoknak a pajzsmirigyhormonok perifériás hatására és/vagy a pajzsmirigyhormonok fejlődő szövetekben való metabolizmusára gyakorolt hatása, mint például a dejodinázgátlók esetében megfigyelt hatás.

▼**M6**

53. A vizsgált állatok kontrollpopulációhoz viszonyított aszinkron fejlődésének értékelése a kísérleti állatok 7. és 21. vizsgálati napon elvégzett makroszkópos morfológiai értékelésén alapul.

54. A *Xenopus laevis* normális fejlődésének Nieuwkoop és Faber által készített leírása (8) megfelelő keretet biztosít a szövetek normál átalakulási sorrendjének azonosításához. Az „aszinkron fejlődés” kifejezés kimondottan az ebihalak általános morfológiai fejlődésében jelentkező azon eltérésekre vonatkozik, amelyek nem teszik lehetővé a fejlődési stádium Nieuwkoop és Faber kritériumai szerinti egyértelmű meghatározását (8), mivel a kulcsfontosságú morfológiai jellemzők különböző stádiumok jellegzetességeit mutatják.

55. Amint az „aszinkron fejlődés” kifejezés is jelzi, csak azokat az eseteket kell figyelembe venni, ahol eltérés figyelhető meg bizonyos szövetek szerkezeti átalakulási folyamatában más szövetek szerkezeti átalakulási folyamatához képest. A klasszikus fenotípusok közé tartozik a mellső végtag megjelenésének késedelme vagy hiánya a hátsó végtagok és a farok szöveteinek normális vagy felgyorsult fejlődése ellenére, illetve a kopoltyúk korai felszívódása a hátsó végtagok morfogeneziséhez és a farok reszorpciójához viszonyítva. Egy állat aszinkron fejlődést mutató egyedként kerül feljegyzésre, ha nem lehet hozzárendelni egyetlen fejlődési stádiumhoz sem, mert nem felel meg a Niewkoop és Faber szerinti, stádiumra jellemző fejlődési kritériumok többségének (8), vagy ha rendkívül nagy késedelem vagy felgyorsulás figyelhető meg egy vagy több főbb jellemző tekintetében (pl. a farok teljesen felszívódott, de a mellső végtagok még nem alakultak ki). Az értékelést kvalitatív alapon végezzük el, és keretében a Nieuwkoop és Faber által felsorolt összes jellemzőt (8) kell vizsgálni. Nem szükséges azonban feljegyezni az állatok különböző jellemzőin megfigyelhető fejlettségi állapotot. Az aszinkron fejlődést mutató állatokat nem rendeljük hozzá egyetlen Nieuwkoop és Faber szerinti fejlődési stádiumhoz (8) sem.

56. A rendellenes morfológiai fejlődés „aszinkron fejlődésként” történő meghatározásának központi kritériuma tehát, hogy a szövetek szerkezeti átalakulásának és a szövetek morfogenezisének relatív időzítése megbomlott, miközben az érintett szövetek morfológiája nem mutat nyilvánvaló rendellenességet. Az általános morfológiai rendellenességek ilyen jellegű értelmezésének illusztrálása képpen, a hátsó végtagok más szövetek fejlődéséhez képest megfigyelhető retardált morfogenezise például teljesíti az „aszinkron fejlődés” kritériumait, míg a hiányzó hátsó végtagok, ujjfejlődési rendellenességek (pl. ectrodactylia, polydactylia) vagy más nyilvánvaló végtagfejlődési rendellenességek nem tekinthetők „aszinkron fejlődésnek”.

57. Ebben az összefüggésben a következő fontosabb morfológiai jellemzők metamorf folyamatainak összehangoltságát kell megvizsgálni: a hátsó végtagok morfogenezise, a mellső végtagok morfogenezise, a mellső végtagok megjelenése, a farok reszorpciójának stádiuma (különösen a farokúszó felszívódása) és a fej morfológiája (pl. a kopoltyú mérete és a kopoltyú reszorpciójának stádiuma, az alsó állkapocs morfológiája, a Meckel-porc kiemelkedése).

58. A kémiai hatástól függően különböző morfológiai fenotípusok is előfordulhatnak. A klasszikus fenotípusok közé tartozik a mellső végtag megjelenésének késedelme vagy hiánya a hátsó végtagok és a farok szöveteinek normális vagy felgyorsult fejlődése ellenére, illetve a kopoltyúk korai felszívódása a hátsó végtagok és a farok szövetszerkezeti átalakulásához viszonyítva.

▼M6

Kórszövettani vizsgálatok

59. Ha a vegyi anyag nem okoz nyilvánvaló toxicitást, nem gyorsítja fel a fejlődést vagy nem okoz aszinkron fejlődést, akkor a pajzsmirigy kórszövettanát a megfelelő iránymutatás segítségével értékeljük ki (9). A fejlődési visszamaradás – toxicitás hiányában – jól jelzi a pajzsmirigygátló hatást, de a fejlődési stádium elemzése kevésbé érzékeny és kisebb diagnosztikus erejű, mint a pajzsmirigy kórszövettani vizsgálata. Ezért ebben az esetben pajzsmirigy-kórszövettani vizsgálatot kell végezni. Fejlődési hatások hiányában is kimutattak már a pajzsmirigy szövettanára gyakorolt hatásokat. Ha változások észlelhetők a pajzsmirigy szövettanában, akkor a vegyi anyag pajzsmirigyre ható anyagnak minősül. Ha a pajzsmirigyben nem figyelhető meg fejlődési visszamaradás vagy szövettani elváltozások, akkor a vegyi anyag pajzsmirigyre nem ható anyagnak minősül. A fenti döntést az alapozza meg, hogy a pajzsmirigy a pajzsmirigyserkentő hormon (TSH) hatása alatt áll, és minden vegyi anyag, amely elegendő mértékben megváltoztatja a keringő pajzsmirigyhormon mennyiségét ahhoz, hogy megváltozzon a TSH kiválasztása, kórszövettani elváltozásokat idéz elő a pajzsmirigyben. Különböző hatások és hatásmechanizmusok változtathatják meg a keringő pajzsmirigyhormon mennyiségét. Tehát míg a pajzsmirigyhormon szintje pajzsmiriggyel összefüggő hatásra utal, önmagában nem elegendő annak meghatározásához, hogy melyik hatás vagy hatásmechanizmus kapcsolódik a válaszhoz.

60. Mivel ez a végpont az alapvető statisztikai módszerekkel nem értékelhető, a vegyi anyagnak való kitettséggel összefüggő hatást kórboncnoki szakvélemény segítségével kell meghatározni.

Késleltetett fejlődés (a fejlődési stádium, a hátsó végtagok hossza, a nedves testtömeg és a farok nélküli testhossz segítségével meghatározva)

61. A késleltetett fejlődés pajzsmirigygátló mechanizmusokon és közvetett toxicitáson keresztül valósulhat meg. A nyilvánvaló toxikus tünetekhez társuló enyhe fejlődési késedelmek valószínűleg nem specifikus toxikus hatást jeleznek. A nem pajzsmirigyre ható toxicitás értékelése lényeges eleme a vizsgálatnak az álpozitív eredmények valószínűségének csökkentése érdekében. A túlzott mortalitás nyilvánvaló jele annak, hogy más mérgező mechanizmusok is működésben vannak. Hasonlóképpen a növekedés nedves testtömegen és/vagy a farok nélküli testhosszon észrevehető enyhe csökkenése is nem a pajzsmirigyre ható toxicitásra utal. A növekedés nyilvánvaló fokozódása gyakran megfigyelhető a normális fejlődésre negatívan ható vegyi anyagok esetében. Következésképpen a nagyobb állatok jelenléte nem feltétlenül utal a nem a pajzsmirigyre ható toxicitásra. Nem szabad azonban kizárólag a növekedésre hagyatkozni a pajzsmirigyre ható toxicitás meghatározásakor. Inkább a növekedés, a fejlődési stádium és a pajzsmirigy-kórszövettan együttesét kell használni a pajzsmirigyre kifejtett hatás megállapításához. További végpontokat is figyelembe kell venni a nyilvánvaló toxicitás meghatározása során, köztük az ödémát, a vérzéses elváltozásokat, a levertséget, a csökkent táplálékfelvételt, a szabálytalan/megváltozott úszási viselkedést stb. Ha minden vizsgálati koncentráció nyilvánvaló toxicitás tüneteit mutatja, a vizsgált vegyi anyagot újra kell értékelni alacsonyabb vizsgálati koncentrációk mellett, mielőtt megállapítanánk, hogy a vegyi anyag potenciálisan pajzsmirigyre ható anyag-e vagy sem.

62. A statisztikailag szignifikáns fejlődési késedelmek – a nyilvánvaló toxicitás egyéb jeleinek hiányában – azt jelzik, hogy a vegyi anyag hat a pajzsmirigyre (antagonisztikus hatás). Statisztikailag megjelenő határozott jelek hiányában a pajzsmirigy kórszövettani eredményeivel lehet kiegészíteni ezt az eredményt.

▼M6

Statisztikai elemzések

63. Az adatok statisztikai elemzéséhez lehetőség szerint az „Aktuális megközelítések az ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató” (11) című dokumentumban leírt eljárásokat kell követni. A monoton dózisválasszal jellemezhető folytonos mennyiségi végpontok (hátsó végtagok hossza, farok nélküli testhossz, nedves testtömeg) esetében a Jonckheere–Terpstra-próbát kell lefelé lépegető eljárással alkalmazni a szignifikáns kezelési hatás meghatározása érdekében.

64. Az olyan folytonos végpontok esetében, amelyek nem jellemezhetők monoton dózisválasszal, meg kell vizsgálni az adatok normalitását (lehetőleg a Shapiro–Wilk- vagy az Anderson–Darling-próba alkalmazásával) és szóráshomogenitását (lehetőleg a Levene-féle próba használatával). Mindkét próbát egy varianciaanalízis (ANOVA) reziduálisain végezzük. Ezeket a formális normalitási és szóráshomogenitási próbákat a szakértői megítélés is helyettesítheti, de a formális próbákat kell előnyben részesíteni. Normalistól eltérő eloszlás vagy szórásheterogenitás esetén normalizáló vagy szórásstabilizáló transzformációt kell keresni. Ha az adatok (esetleg a transzformáció után) normál eloszlásúak homogén szórással, a szignifikáns kezelési hatást a Dunnett-féle próbával határozzuk meg. Ha az adatok (esetleg a transzformáció után) normál eloszlásúak heterogén szórással, a szignifikáns kezelési hatást a Tamhane–Dunnett-féle vagy a T3-próbával, illetve a Mann–Whitney–Wilcoxon-féle U-próbával határozzuk meg. Amennyiben nem található normalizáló transzformáció, a szignifikáns kezelési hatást a Mann–Whitney–Wilcoxon-féle U-próbával határozzuk meg, a p-értékek Bonferroni–Holm-féle korrekciója segítségével. A Dunnett-féle próbát bármely ANOVA F-próbától függetlenül alkalmazzuk, illetve a Mann–Whitney-féle próbát bármely általános Kruskall–-Wallis-féle próbától függetlenül alkalmazzuk.

65. Szignifikáns mortalitás nem várható, de meg kell vizsgálni lefelé lépegető eljárással alkalmazott Cochran–Armitage-féle próbával, ha az adatok összhangban vannak a dózisválasz monotonitással, egyébként pedig a Fisher-féle egzakt próbával, Bonferroni-Holm-féle korrekcióval.

66. A kezelés fejlődési stádiumra gyakorolt szignifikáns hatását az ismétlések középértékeire alkalmazott lefelé lépegető Jonckheere–Terpstra próbával határozzuk meg. Alternatív megoldásként – és ez részesítendő előnyben – a 20–80. percentilisből végzett multikvantális Jonckheere-féle próbát kell használni a hatás meghatározásához, mivel ez figyelembe veszi az eloszlási profil változásait.

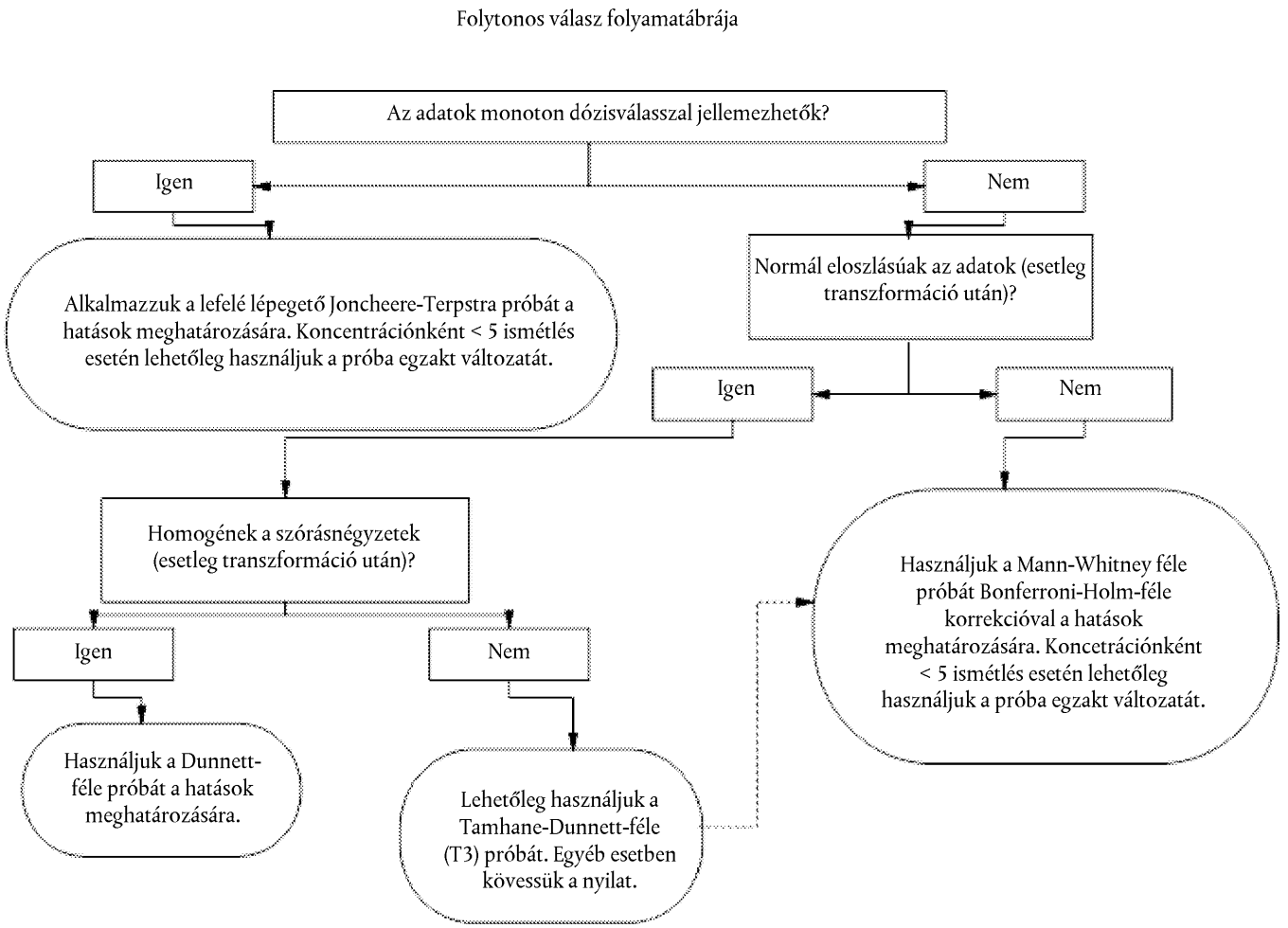
67. Az elemzés egysége az ismétlés, így az adatok az ismétlések középértékeiből állnak, ha a Jonckheere–Terpstra-féle próbát vagy a Mann–Whitney-féle U-próbát használjuk, illetve az ismétlések átlagaiból, ha a Dunnett-féle próbát használjuk. A dózisválasz monotonitását vizuálisan lehet értékelni az ismétlések és a kezelések átlagaiból vagy középértékeiből, vagy az előzőekben leírt formális próbákból (11). Ha a kezelések vagy a kontrollok kevesebb mint öt ismétlésből állnak, a Jonckheere–Terpstra-féle és a Mann–Whitney-féle próba pontos permutációs változatait kell használni, ha rendelkezésre állnak. A megadott összes vizsgálat statisztikai szignifikanciáját 0,05-os szignifikanciaszint mellett ítéljük meg.

68. A 4. ábrán látható folyamatábra a statisztikai vizsgálatok folytonos adatokon történő elvégzését szemlélteti.

▼M6

4. ábra

A folytonos válaszadatokon alkalmazható statisztikai módszerek folyamatábrája.



▼M6

Különleges adatelemzési szempontok

Érvénytelen kezelési szintek használata

69. Számos tényezőt kell figyelembe venni annak eldöntésekor, hogy az ismétlés vagy a teljes kezelés nyilvánvaló toxicitást mutat-e, melynek következtében ki kell zárni az elemzésből. A nyilvánvaló toxicitás meghatározása: > 2 elhullás bármelyik ismétlésben, amely csak toxicitással magyarázható, technikai hibával nem. A nyilvánvaló toxicitás egyéb tünetei közé tartoznak a vérzés, a rendellenes viselkedés, a rendellenes úszásminták, az anorexia és bármely egyéb betegségre utaló klinikai tünet. A toxicitás szubletális jelei tekintetében kvalitatív értékelésre lehet szükség, amelyet mindig a tiszta vizes kontrollcsoporthoz viszonyítva kell elvégezni.

Oldószeres kontrollok

70. Oldószer használatát csak a legvégső esetben szabad megfontolni, ha már minden egyéb kémiai bejuttatási lehetőséget számításba vettünk. Ha oldószert használunk, akkor párhuzamosan egy tiszta vizes kontrollt is kell futtatni. A vizsgálat befejezésekor értékelni kell az oldószer lehetséges hatásait. Ezt az oldószeres kontrollcsoport és a tiszta vizes kontrollcsoport statisztikai összehasonlítása útján végezzük el. A legfontosabb vizsgálandó végpontok az elemzés során a fejlődési stádium, a farok nélküli testhossz és a nedves tömeg, mivel a pajzsmirigyre nem ható toxicitás ezeket tudja befolyásolni. Ha statisztikailag szignifikáns különbségeket mutatunk ki a tiszta vizes és az oldószeres kontrollcsoportok között e végpontok tekintetében, a vizsgálati végpontokhoz kapcsolódó válaszértékeket a tiszta vizes kontroll segítségével határozzuk meg. Ha nincs statisztikailag szignifikáns különbség a tiszta vizes és az oldószeres kontroll között a mért válaszváltozók tekintetében, a vizsgálati végpontokhoz kapcsolódó válaszértékeket az összevont hígítóvizes és oldószeres kontrollok segítségével határozzuk meg.

A 60. és afeletti fejlődési stádiumokat elérő kezelési csoportok

71. A 60. stádium után – a szöveti reszorpció és az abszolút víztartalom csökkenése miatt – az ebihalak mérete és tömege csökken. Emiatt a nedves tömeg és a farok nélküli testhossz mért értékeit nem lehet felhasználni a növekedési sebességben mutatkozó különbségek kimutatását célzó statisztikai vizsgálatokhoz. Ezért a > 60. Nieuwkoop és Faber szerinti fejlődési stádiumban lévő szervezetekről felvett nedvestömeg- és testhosszadatokat cenzúrázni kell, és nem használhatók az ismétlések átlagainak vagy az ismétlések középértékeinek elemzése során. Két különböző megközelítést lehet alkalmazni ezeknek a növekedéssel kapcsolatos paramétereknek az elemzésére.

72. Az egyik megközelítés szerint a nedves tömeg és/vagy a farok nélküli testhossz statisztikai elemzése során csak a 60. vagy korábbi fejlődési stádiumokban lévő ebihalakat lehet figyelembe venni. Erről úgy vélik, hogy kellően megbízható információt szolgáltat a lehetséges növekedési hatások súlyossága tekintetében, feltéve, hogy a kísérleti állatoknak csak egy kis hányadát zárják ki az elemzésekből (≤ 20 %). Ha egy vagy több névleges koncentráció esetében nagyobb mennyiségű ebihal mutat a 60. stádiumon túli fejlettséget (≥ 20 %), akkor az összes ebihalon kéttényezős ANOVA-t kell végrehajtani beágyazott varianciastruktúrával a vegyi anyaggal történt kezelések következtében fellépő növekedési hatások felméréséhez, figyelembe véve a fejlődés késői stádiumának hatását a növekedésre. A 3. függelék útmutatást ad a tömeg és a testhossz kéttényezős ANOVA elemzése tekintetében.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 – Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.

▼**M6**

(2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 – Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76. Paris

(3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92. Paris

(4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

(5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelphia, PA

(6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX). E 1439-98

(7) Kahl,M.D., Russom,C.L., DeFoe,D.L. & Hammermeister,D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, pp. 539-551

(8) Nieuwkoop,P.D. & Faber,J. (1994) Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing, New York

(9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris

(10) Dodd,M.H.I. & Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599

(11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris

(12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

▼M6

1. függelék

1. táblázat

A 21 napos kétéltű-átalakulási vizsgálat kísérleti feltételei

Vizsgált állat		*Xenopus laevis* lárvák	
Lárvák kezdeti fejlődési stádiuma		Nieuwkoop és Faber szerinti 51. stádium	
Expozíciós időtartam		21 nap	
Lárvák kiválasztási kritériumai		Fejlődési stádium és teljes testhossz (választható)	
Vizsgálati koncentrációk		Minimum 3 koncentráció körülbelül egy nagyságrenden belül	
Expozíciós rendszer		Átfolyásos (preferált) és/vagy statikus megújítási rendszer	
Vizsgálati rendszer áramlási sebessége		25 ml/perc (a teljes térfogat cseréje kb. 2,7 óránként)	
Elsődleges végpontok / Meghatározás napja		Mortalitás	Naponta
		Fejlődési stádium	7. és 21. nap
		Hátsó végtagok hossza	7. és 21. nap
		Farok nélküli testhossz	7. és 21. nap
		Nedves testtömeg	7. és 21. nap
		Pajzsmirigy szövettana	21. nap
Hígítóvíz / Laboratóriumi kontroll		Klórmentes csapvíz (faszénnel szűrt) vagy ezzel egyenértékű laboratóriumi vízforrás	
Lárvasűrűség		20 lárva/vizsgálati edény (5/l)	
Vizsgálati oldat / Vizsgálati edény		4–10 l (10–15 cm minimális vízszint) / üveg vagy rozsdamentes acél vizsgálati edény (pl. 22,5 cm x 14 cm × 16,5 cm)	
Ismétlések		4 párhuzamos vizsgálati edény / vizsgálati koncentráció és kontroll	
Elfogadható mortalitási arány a kontrollokban		≤ 10 % párhuzamos vizsgálati edényenként	
Pajzsmirigy fixálása	Fixált állatok száma	Minden ebihal (kezdetben ismétlésenként 5 db állatot értékelünk)	
	Testtáj	Fej vagy teljes test	
	Fixálóoldat	Davidson-féle fixálószer	
Táplálás	Táplálék	Sera Micron® vagy azzal egyenértékű	
	Mennyiség / Gyakoriság	A Sera Micron®-ra vonatkozó etetési rendet lásd az 1. táblázatban	
Megvilágítás	Megvilágítási időszak	12 óra világos: 12 óra sötét	

▼**M6**

	Erősség	600–2 000 lux (a víz felszínén mérve)
Vízhőmérséklet		22 ± 1 °C
pH		6,5–8,5
Oldott oxigén (DO) koncentrációja		> 3,5 mg/l (a levegőtelítettség > 40 %-a)
Mintavételi ütemterv analitikai kémiai vizsgálatokhoz		Egyszer / Hetente (4 mintavételezés / vizsgálat)

▼M6

2. függelék

Táblázat a nyers és összesített adatok jegyzőkönyvezéséhez

1. táblázat

Általános információ a vizsgált vegyi anyagról

Kémiai információ			
	Adja meg a vizsgált vegyi anyagot, a koncentrációt és a kezeléseket		
	Vizsgált vegyi anyag:		
	Koncentrációegységek:		
	1. kezelés		
	2. kezelés		
	3. kezelés		
	4. kezelés		
	Dátum (0. nap):		Adja meg a dátumot (éé/hh/nn)
	Dátum (7. nap):		Adja meg a dátumot (éé/hh/nn)
	Dátum (21. nap):		Adja meg a dátumot (éé/hh/nn)

2. táblázat

Adatgyűjtő lapok a nyers adatok rögzítéséhez, 7. és 21. nap

X. NAP
DÁTUM 00/00/00

	Koncent-ráció	Kezelés sorszáma	Ismétlés sorszáma	Egyed száma	Egyed azonosítója	Fejlődési stádium	Farok nélküli test-hossz (mm)	Hátsó végtagok hossza (mm)	Teljes orga-nizmus nedves tömege (mg)
SOR	KEZ.	KEZ.SZ.	ISM.	EGY.SZ.	EGY.AZ.	STÁD.	TH	HVH	SÚLY
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**

	Koncentráció	Kezelés sorszáma	Ismétlés sorszáma	Egyed száma	Egyed azonosítója	Fejlődési stádium	Farok nélküli testhossz (mm)	Hátsó végtagok hossza (mm)	Teljes organizmus nedves tömege (mg)
SOR	KEZ.	KEZ.SZ.	ISM.	EGY.SZ.	EGY.AZ.	STÁD.	TH	HVH	SÚLY
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**

	Koncentráció	Kezelés sorszáma	Ismétlés sorszáma	Egyed száma	Egyed azonosítója	Fejlődési stádium	Farok nélküli testhossz (mm)	Hátsó végtagok hossza (mm)	Teljes organizmus nedves tömege (mg)
SOR	KEZ.	KEZ.SZ.	ISM.	EGY.SZ.	EGY.AZ.	STÁD.	TH	HVH	SÚLY
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**

	Koncentráció	Kezelés sorszáma	Ismétlés sorszáma	Egyed száma	Egyed azonosítója	Fejlődési stádium	Farok nélküli testhossz (mm)	Hátsó végtagok hossza (mm)	Teljes organizmus nedves tömege (mg)
SOR	KEZ.	KEZ.SZ.	ISM.	EGY.SZ.	EGY.AZ.	STÁD.	TH	HVH	SÚLY
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

▼**M6**

3. táblázat

A 7. és a 21. napon mért végpontra vonatkozó adatok összegzése

		Fejlődési stádium			Farok nélküli testhossz (mm)		Hátsó végtagok hossza (mm)		Tömeg (mg)	
KEZELÉS	ISMÉTLÉS	MINIMUM	KÖZÉPÉRTÉK	MAXIMUM	ÁTLAG	SZÓRÁS	ÁTLAG	SZÓRÁS	ÁTLAG	SZÓRÁS
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!

Megjegyzések: A cellákban lévő számítások a 2. táblázatba bejegyzett adatokhoz kapcsolódnak.

4. táblázat

Napi mortalitási adatok

Vizsgálati nap	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**

Vizsgálati nap	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!																
Ismétlések száma		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kezelések száma		0				0				0				0			

Megjegyzések: A cellákban lévő számítások a 1. táblázatba bejegyzett adatokhoz kapcsolódnak.

5. táblázat

Vízminőségi kritériumok

Expozíciós rendszer (átfolyásos/statikus megújítási)
Hőmérséklet:
Megvilágítás erőssége
Megvilágítási időszak:
Táplálék:
Etetési gyakoriság:
víz pH-ja:
A vizsgálati víz jódkoncentrációja:

▼**M6**

6. táblázat

Összefoglaló kémiai adatok

Kémiai név:																				
CAS-szám:																				
Vizsgálati nap	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!																				

Megjegyzés: A cellákban lévő számítások a 1. táblázatba bejegyzett adatokhoz kapcsolódnak.

▼**M6**

7. táblázat

Táblázatok az alapvető kórszövettani kritériumok jegyzőkönyvezéséhez

Dátum: Vegyi anyag: Kórboncnok:

Kontrollállat azonosítója – 1. ismétlés	Kontrollállat azonosítója – 2. ismétlés	Pajzsmirigy-hypertrophia	Pajzsmirigy-atrophia	Follikulárissejt-hypertrophia	Follikulárissejt-hyperplasia
Összesen:					

Kontrollállat azonosítója – 1. ismétlés	Kontrollállat azonosítója – 2. ismétlés	Pajzsmirigy-hypertrophia	Pajzsmirigy-atrophia	Follikulárissejt-hypertrophia	Follikulárissejt-hyperplasia
Összesen:					

Kontrollállat azonosítója – 1. ismétlés	Kontrollállat azonosítója – 2. ismétlés	Pajzsmirigy-hypertrophia	Pajzsmirigy-atrophia	Follikulárissejt-hypertrophia	Follikulárissejt-hyperplasia
Összesen:					

Kontrollállat azonosítója – 1. ismétlés	Kontrollállat azonosítója – 2. ismétlés	Pajzsmirigy-hypertrophia	Pajzsmirigy-atrophia	Follikulárissejt-hypertrophia	Follikulárissejt-hyperplasia
Összesen:					

▼**M6**

8. táblázat

Kiegészítő kórszövettani kritériumok

Dátum: Vegyi anyag: Kórboncnok:

Kontrollállat azonosítója – 1. ismétlés	Kontrollállat azonosítója – 2. ismétlés	Follikuláris lumen kitágulása	Follikuláris lumen összeszűkülése
Összesen:			

Kezelt állat azonosítója – 1. ismétlés	Kezelt állat azonosítója – 2. ismétlés	Follikuláris lumen kitágulása	Follikuláris lumen összeszűkülése
Összesen:			

Kezelt állat azonosítója – 1. ismétlés	Kezelt állat azonosítója – 2. ismétlés	Follikuláris lumen kitágulása	Follikuláris lumen összeszűkülése
Összesen:			

Kezelt állat azonosítója – 1. ismétlés	Kezelt állat azonosítója – 2. ismétlés	Follikuláris lumen kitágulása	Follikuláris lumen összeszűkülése
Összesen:			

▼**M6**

9. táblázat

A kórszövettani vizsgálatok eredményeinek szöveges leírása

Dátum:

Vegyi anyag:

Kórboncnok:

		Szöveges leírás
Kontrollállat azonosítója – 1. ismétlés		
Kontrollállat azonosítója – 2. ismétlés		
Kezelt állat azonosítója – 1. ismétlés		
Kezelt állat azonosítója – 2. ismétlés		

▼**M6**

Kontrollállat azonosítója – 1. ismétlés		
Kezelt állat azonosítója – 2. ismétlés		
Kontrollállat azonosítója – 1. ismétlés		
Kontrollállat azonosítója – 2. ismétlés		

▼M6

10. táblázat:

Összefoglaló mintatáblázat az AMA x. (7. vagy 21.) napi adatainak jegyzőkönyvezéséhez

		Kontroll				1. dózis					2. dózis					3. dózis				
Végpont	Ismétlés	Átlag	Szórás	KV	N	Átlag	Szórás	KV	N	p-érték	Átlag	Szórás	KV	N	p-érték	Átlag	Szórás	KV	N	p-érték
Hátsó végtagok Hossz (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Átlag:																			
Farok nélküli testhossz (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Átlag:																			
Nedves tömeg (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Átlag:																			

▼M6

11. táblázat

Összefoglaló mintatáblázat az AMA × (7. vagy 21.) napi fejlődési stádiumra vonatkozó adatainak jegyzőkönyvezéséhez

		Kontroll				1. dózis					2. dózis					3. dózis				
	Ismétlés	Közép-érték	Min	Max	N	Közép-érték	Min	Max	N	p-érték	Közép-érték	Min	Max	N	p-érték	Közép-érték	Min	Max	Közép-érték	p-érték
Fejlődési stádium	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Átlag:																			

▼M6

3. függelék

A tömeg és a hosszúság alternatív elemzése, ha egy vagy több koncentrációnál a fejlődés késői stádiuma figyelhető meg az ebihalak több mint 20 %-ánál

Ha egy vagy több névleges koncentráció esetében nagyobb mennyiségű ebihal mutat a 60. stádiumon túli fejlettséget (≥ 20 %), akkor az összes ebihalon kéttényezős ANOVA-t kell végrehajtani beágyazott varianciastruktúrával a vegyi anyaggal történt kezelések következtében fellépő növekedési hatások felméréséhez, figyelembe véve a fejlődés késői stádiumának hatását a növekedésre.

A javasolt eljárás lényege, hogy minden adatot fel kell használni, de figyelembe kell venni a késői fejlődési stádium hatását. Ezt beágyazott varianciastruktúrával végzett kéttényezős ANOVA-val lehet elérni. A KésőiStád. = „Igen” legyen egy adott állat esetében, ha a fejlődési stádiuma 61 vagy annál nagyobb. Ellenkező esetben a KésőiStád. = „Nem” legyen. Ezután el lehet végezni a kéttényezős ANOVA elemzést a koncentráció és a KésőiStád., valamint azok kölcsönhatásának használatával, ahol az Ism.(Konc.) egy véletlen tényező és az Ebihal(Ism.) egy másik véletlen hatás. Ez az eljárás változatlanul az ismétléseket (Ism.) kezeli az elemzés egységeként és lényegében ugyanazt az eredményt adja, mint az ismétlés*késői stádium átlagok súlyozott elemzése, az átlagonkénti állatok számával súlyozva. Ha az adatok nem felelnek meg az ANOVA normalitásra vagy szóráshomogenitásra vonatkozó alkalmazási feltételeinek, normalizált rangsorolásos transzformációt lehet végezni e kifogás kiküszöbölése érdekében.

A Konc., illetve a KésőiStád. hatásainak és azok kölcsönhatásának szokásos ANOVA F-próbái mellett az interakciós F-próbát szét lehet „vágni” két további ANOVA F-próbára: az egyik próba az egyes koncentrációk mellett adott átlagos válaszokra vonatkozik, ha KésőiStád. = „Nem”, a másik pedig az egyes koncentrációk mellett adott átlagos válaszokra, ha KésőiStád. = „Igen”. A KésőiStád. valamennyi további szintjén összehasonlításokat végzünk a kezelések átlagai és a kontrollok között. Trendtípusú elemzést lehet végezni megfelelő ellentétek használatával, vagy egyszerű páronkénti összehasonlításokat is lehet készíteni, ha nem monoton dózisválaszra vonatkozó bizonyíték van a késői stád. változó valamely szintjén belül. A p-értékek Bonferroni–Holm-féle korrekcióját csak akkor kell elvégezni, ha a hozzá tartozó F-próbarész nem szignifikáns. Ezt az SAS-ban és feltehetően más statisztikai szoftverekben is el lehet végezni. Komplikációk léphetnek fel, ha bizonyos koncentrációkban nincsenek késői stádiumú állatok, de ezeket a helyzeteket egyszerűen lehet kezelni.

▼**M6**

4. függelék

Fogalommeghatározások

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼M6

C.39. UGRÓVILLÁSOK SZAPORODÁSÁNAK TALAJBAN VÉGZETT VIZSGÁLATA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 232. vizsgálati iránymutatásában (2009) leírt módszerrel. Ezt a vizsgálati módszert a vegyi anyagok ugróvillások talajban megfigyelhető szaporodási teljesítményére kifejtett hatásának vizsgálatára tervezték. A vizsgálati módszer meglévő eljárásokon alapul (1) (2). A partenogenetikus (szűznemzéses) *Folsomia candida* és az ivarosan szaporodó *Folsomia fimetaria* az ugróvillások két leginkább elérhető faja, amelyek tenyészthetők és kereskedelemi forgalomban is kaphatók. Amikor olyan élőhelyeket kell értékelni ahol e két faj nincs jelen, az eljárás kiterjeszthető más ugróvillás fajokra is, ha azok képesek teljesíteni a vizsgálat érvényességi kritériumait.

2. A talajlakó ugróvillások ökológiailag releváns fajok az ökotoxikológiai vizsgálatok szempontjából. Az ugróvillások hexapod állatok, amelyeknek vékony, levegő és víz számára nagymértékben átjárható külső vázuk van, és a földigilisztákhoz és a televényférgekhez képest eltérő expozíciós útvonalat és sebességet mutató ízeltlábú fajt képviselnek.

3. Számos szárazföldi ökoszisztémában az ugróvillások populációsűrűsége a talajban és az avarrétegben gyakran eléri a $10^5/m^2$ értéket (3) (4). A felnőtt egyedek jellemzően 0,5–5 mm méretűek, és hozzájárulásuk a talaj összes állati biomasszájához és légzéséhez alacsony, 1–5 %-ra becsülhető (5). A legfontosabb szerepet ezért vélhetően különféle folyamatok szabályozásában töltik be a mikroorganizmusok és a mikrofauna elfogyasztása révén. Az ugróvillások zsákmányállatok a legkülönbözőbb endogeikus és epigeikus gerinctelenek, például az atkák, a százlábúak, a pókok, a futrinkafélék és a holyvafélék számára. Az ugróvillások a savanyú talajokban hozzájárulnak a bomlási folyamatokhoz. Ezekben a talajfajtákban talán a legfontosabb talajlakó gerinctelenek számítanak a televényférgek mellett, hiszen innen a földigiliszták és az ikerszelvényesek jellemzően hiányoznak.

4. A *F. fimetaria* az egész világon elterjedt és több talajtípusban is fellelhető a homokos talajoktól az agyagos talajokig, illetve a mull talajoktól a mor talajokig. Szem nélküli, nem pigmentált ugróvillás. Mezőgazdasági talajokban való előfordulását Európa-szerte feljegyezték (6). Mindenevő, beleértve a gombafonalakat, baktériumokat, egysejtűeket és törmeléket. A legelésen keresztül kölcsönhatásba lép a növénypatogén gombák okozta fertőzésekkel (7), és befolyásolhatja a mikorrhizákat, amint az a *F. candida* tekintetében közismert. A legtöbb ugróvillás fajhoz hasonlóan ivarosan szaporodik és a peték megtermékenyítéséhez a hímek állandó jelenléte szükséges

5. A *F. candida* is világszerte előfordul. Bár a legtöbb természetes talajban ritka, a humuszban gazdag területeken gyakran rendkívül nagy számban fordul elő. Szem nélküli, nem pigmentált ugróvillás. Jól fejlett furcával (ugróvillával) és aktív futó mozgással rendelkezik, és azonnal elugrik, ha megzavarják. A *F. candida* ökológiai szerepe hasonló a *F. fimetaria*-éhoz, de élőhelyei szerves anyagokban gazdagabb talajok. Szűznemzéssel szaporodik. A hímek előfordulási aránya kevesebb, mint 1 ezrelék.

A VIZSGÁLAT ELVE

6. Szinkron kifejlett (*F. fimetaria*) vagy fiatal (*F. candida*) ugróvillásokat teszünk ki a vizsgált vegyi anyag 5 % szervesanyag-tartalmú módosított mesterséges talajba (8) (vagy alternatív talajba) kevert különböző koncentrációinak. A vizsgálati forgatókönyv két lépésre osztható:

— Dózisbehatároló vizsgálat (ha nem áll rendelkezésre elegendő információ a toxicitás tekintetében), amelynek során a fő végpontok a mortalitás és a

▼M6

szaporodás, amelyeket 2 hét után értékelünk a *F. fimetaria* és 3 hét után a *F. candida* esetében.

— Meghatározó szaporodási vizsgálat, amelyben a szülőállatok által nemzett fiatal állatok teljes számát, valamint a szülőállatok túlélési arányát értékeljük. A meghatározó vizsgálat időtartama 3 hét a *F. fimetaria* és 4 hét a *F. candida* esetében.

A vizsgált vegyi anyagnak a felnőtt állatok mortalitására és reprodukciós teljesítményére kifejtett toxikus hatását az LC_x és az EC_x értékekkel fejezzük ki (az adatoknak nemlineáris regresszió útján egy megfelelő modellhez történő illesztésével, hogy megbecsülhessük azt a koncentrációt, amely x % mortalitást okozna vagy a reprodukciós teljesítmény x %-os csökkenését okozná), vagy alternatív megoldásként a NOEC/LOEC értékekkel (9).

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

7. Lehetőleg ismerni kell a vizsgált vegyi anyag fizikai tulajdonságait, vízben való oldhatóságát, log K_{ow} értékét, talaj/víz megoszlási hányadosát és gőznyomását. Kívánatosak a vizsgált vegyi anyag talajban bekövetkező sorsára vonatkozó további információk is, mint például a fotolízis, a hidrolízis és a biotikus lebomlás sebessége. Amennyiben rendelkezésre áll, dokumentálni kell a vizsgált vegyi anyag IUPAC-nómenklatúra szerinti kémiai azonosítását, CAS-számát, tételszámát, szerkezeti képletét és tisztaságát.

8. E vizsgálati módszer vízben oldható vagy oldhatatlan vegyi anyagok esetében egyaránt használható. A vizsgált vegyi anyag alkalmazásának módja azonban ennek megfelelően eltérő lesz. A vizsgálati módszer nem alkalmazható illékony vegyi anyagok esetében, azaz olyan vegyi anyagoknál, amelyek Henry-féle állandója vagy levegő/víz megoszlási hányadosa egynél nagyobb, illetve olyan vegyi anyagok esetében, amelyek gőznyomása 25 °C-on meghaladja a 0,0133 Pa értéket.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

9. A vizsgálati eredmény érvényességéhez a kezeletlen kontrolloknak a következő kritériumoknak kell megfelelniük:

— A kifejlett egyedek átlagos mortalitása a vizsgálat végén nem haladja meg a 20 %-ot;

— A fiatal egyedek átlagos száma a vizsgálat végén edényenként legalább 100;

— A fiatal egyedek átlagos számának relatív szórása a meghatározó vizsgálat végén nem haladja meg a 30 %-ot.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

10. A választott vizsgálati talajtípus esetében szabályos időközönként vagy esetleg minden egyes vizsgálatba beépítve egy referencia-vegyianyagot is vizsgálni kell az anyag EC_{50} koncentrációjában annak ellenőrzésére, hogy a vizsgálati rendszerben részt vevő vizsgálati organizmusok a normális szinteken belül reagálnak. Megfelelő referencia-vegyianyag a bórsav, amelynek 100 mg/kg száraz talaj koncentrációja mindkét faj esetében körülbelül 50 %-kal kell, hogy csökkentse a szaporodást (10) (11).

A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

Vizsgálati edények és berendezések

11. Megfelelő vizsgálati edények a 30 g nedves talaj tárolására alkalmas tartályok, amelyeknek üvegből vagy inert (nem toxikus) műanyagból kell lenniük. A műanyag tartályok használatát azonban el kell kerülni, ha a szorpció miatt a vizsgált vegyi anyagnak való expozíció csökken. A vizsgálati edény keresztmetszetének akkorának kell lennie, hogy a vizsgálati

▼M6

edényben 2–4 cm-es tényleges talajmélység legyen elérhető. Az edényeknek (pl. üveg vagy polietilén) fedéllel kell rendelkezniük, amely csökkenti a víz párolgását, miközben lehetővé teszi a gázcserét a talaj és a légkör között. A tartálynak legalább részben átlátszónak kell lennie, hogy áteressze a fényt.

12. Általános laboratóriumi felszerelések, így különösen a következők szükségesek:

— szárítószekrény;

— sztereomikroszkóp;

— pH-mérő és megvilágításmérő;

— megfelelő, pontos mérlegek;

— megfelelő hőmérséklet-szabályozó eszközök;

— megfelelő páratartalom-szabályozó eszközök (nem szükséges, ha az expozíciós edényeket fedél takarja);

— szabályozott hőmérsékletű inkubátor vagy kis helyiség;

— csipesz vagy alacsony szívóhatású levegőáramoltató eszköz.

A vizsgálati talaj előkészítése

13. Módosított mesterséges talajt (8) használunk 5 % szervesanyag-tartalommal. Alternatív megoldásként természetes talajt is lehet használni, mivel a mesterséges talaj nem hasonlít a természetes talajokra. A mesterséges talaj javasolt összetétele a következő (száraz tömegek alapján, 105 °C-on tömegállandóságig szárítva):

— 5 % tőzegmoha, levegőn szárított és finomra őrölt (a 2 ± 1 mm-es részecskeméret elfogadható);

— 20 % kaolinagyag (lehetőleg 30 % feletti kaolinittartalommal);

— körülbelül 74 % levegőn szárított kvarchomok (a $CaCO_3$ szükséges mennyiségétől függően), túlnyomórészt finom homok, legalább 50 %-ban 50–200 mikron közötti részecskeméretttel. A homok pontos mennyisége a $CaCO_3$ mennyiségétől függ (lásd lent), együttes mennyiségüknek el kell érnie a 75 %-ot.

— 1,0 % kalcium-karbonát ($CaCO_3$, porított, analitikai tisztaságú) pH = 6,0 ± 0,5 eléréséhez; a hozzáadandó kalcium-karbonát mennyisége elsősorban a tőzeg minőségétől/jellegétől függ (lásd az 1. megjegyzést).

1. megjegyzés: A szükséges $CaCO_3$ mennyisége a talajszubsztrátum komponenseitől függ és előzetesen inkubált nedvestalaj-részminták pH-jának közvetlenül a vizsgálat előtt történő mérése útján kell meghatározni.

2. megjegyzés: Javasolt megmérni a talaj pH-ját és adott esetben C/N arányát, kationcserélő kapacitását (Cation Exchange Capacity, CEC) és szervesanyag-tartalmát is a későbbi normalizáció és az eredmények jobb értelmezése érdekében.

3. megjegyzés: Szükség esetén – például specifikus vizsgálati célokból – nem szennyezett területről származó természetes talajok is szolgálhatnak vizsgálati és/vagy tenyésztőszubsztrátumként. Ha természetes talajt használunk, annak jellemzői közül legalább az eredetét (gyűjtőhely), pH-ját, textúráját (szemcseméret-eloszlás), CEC-értékét és szervesanyag-tartalmát fell kell jegyezni. A természetes talajok meghatározó vizsgálatban történő használata előtt ajánlatos igazolni azok vizsgálatra és a vizsgálat érvényességi kritériumainak teljesítésére való alkalmasságát.

▼M6

14. A talaj száraz összetevőit alaposan összekeverjük (például nagyüzemi méretű laboratóriumi keverőgéppel). A mesterséges talaj maximális víztartó képességét (WHC) a 5. függelékében leírt eljárásokkal összhangban határozzuk meg. A vizsgálati talaj nedvességtartalmát optimalizálni kell, hogy laza, porózus talajszerkezetet kapjunk, amely lehetővé teszi az ugróvillások számára a pórusokba való bejutást. Ez általában a maximális WHC 40–60 %-a közé esik.

15. A savasság kiegyensúlyozása/stabilizálása érdekében a száraz mesterséges talajt a vizsgálat kezdete előtt 2–7 nappal előnedvesítjük annyi ioncserélt víz hozzáadásával, hogy a végső víztartalom körülbelül felét érjük el. A pH-érték meghatározása céljából talaj és 1 mólos kálium-klorid (KCl) vagy 0,01 mólos kalcium-klorid ($CaCl_2$) oldat 1:5 arányú keverékét használjuk (a 6. függelék szerint). Ha a talaj az elvárt tartománynál savasabb, a pH-t megfelelő mennyiségű $CaCO_3$ hozzáadásával állíthatjuk be. Ha a talaj túl lúgos, pH-ját az ugróvillásokra ártalmatlan szervetlen sav hozzáadásával állíthatjuk be.

16. Az előnedvesített talajt a vizsgálati koncentrációk (és adott esetben a referencia-vegyianyagok), illetve a vizsgálatban használt kontrollok számának megfelelő számú részre osztjuk. Hozzáadjuk a vizsgált vegyi anyagokat, és a víztartalmat a 24. pont szerint beállítjuk.

A vizsgálati állatok kiválasztása és előkészítése

17. Az ajánlott faj a partenogenetikus *F. candida*, mivel ez a faj a vizsgálati módszer körvizsgálatában (11) gyakrabban teljesítette a túlélési arányra vonatkozó érvényességi kritériumokat, mint a *F. fimetaria*. Ha más fajt használunk, annak meg kell felelnie a 9. pontban felvázolt érvényességi kritériumoknak. A vizsgálat elején a vizsgálati állatoknak jól tápláltnak és a *F. fimetaria* esetén 23–26 napos, a *F. candida* esetén pedig 9–12 napos korúnak kell lenniük. Minden ismétlésnek 10 hím és 10 nőstény *F. fimetaria* ugróvillást kell tartalmaznia, a *F. candida* esetében pedig 10 nőstényt kell használni (lásd a 2. és 3. függeléket). A szinkron állatokat véletlenszerűen választjuk ki az edényekből, és az ismétlésekhez adott minden adag ugróvillás esetében ellenőrizzük az állatok egészségi és fizikai állapotát. A 10/20 egyedből álló csoportokat véletlenszerűen kiválasztott vizsgálati tartályokba tesszük, és a *F. fimetaria* nőstényei közül nagy egyedeket választunk ki, hogy azok jól megkülönböztethetőek legyenek a *F. fimetaria* hímeitől.

A vizsgálati koncentrációk elkészítése

18. A vizsgált vegyi anyag bevitelére négy módszer használható: 1) a vizsgált vegyi anyag vízzel mint hordozóval történő bekeverése a talajba, 2) a vizsgált vegyi anyag szerves oldószer hordozóval történő bekeverése a talajba, 3) a vizsgált vegyi anyag homok hordozóval történő bekeverése a talajba, vagy 4) a vizsgált vegyi anyag talajfelszínen történő alkalmazása. A vegyi anyag tulajdonságai és a vizsgálat célja határozzák meg, hogy melyik a megfelelő módszer. Általánosságban a vizsgált vegyi anyag talajba történő bekeverése ajánlott. Ugyanakkor olyan bejuttatási eljárásokra is szükség lehet, amelyek összhangban vannak a vizsgált vegyi anyag gyakorlati alkalmazásával (például folyékony készítmény permetezése vagy olyan speciális növényvédőszer-készítmények használata, mint a granulátumok vagy csávázószerek). A talajt az ugróvillások hozzáadása előtt kezeljük, kivéve, amikor a vizsgált vegyi anyagot a talaj felszínén alkalmazzuk. Ilyenkor előbb hagyjuk, hogy az ugróvillások bejussanak a talajba.

Vízben oldódó vegyi anyagok

19. A vizsgált anyagból ioncserélt vízben olyan mennyiségű oldatot készítünk, amely az adott vizsgálati koncentráció összes ismétléséhez elegendő. A vizsgálati edénybe történő bejuttatás előtt a vizsgált vegyi anyagból készített minden oldatot alaposan összekeverünk egy adag előnedvesített talajjal.

Vízben oldhatatlan vegyi anyagok

20. Vízben oldhatatlan, de szerves oldószerekben oldható vegyi anyagok esetében a vizsgált vegyi anyagot fel lehet oldani egy megfelelő oldószer

▼M6

(például aceton) olyan lehető legkisebb mennyiségében, amely mellett a vegyi anyag még megfelelően elkeveredik a talajban, majd össze kell keverni a szükséges kvarchomok egy részével. Csak illékony oldószereket szabad használni. Amikor szerves oldószert használunk, minden vizsgálati koncentrációnak és a kiegészítő negatív oldószeres kontrollnak is a hordozó azonos minimális mennyiségét kell tartalmaznia. A vizsgált vegyi anyag alkalmazásához használt tartályokat egy ideig fedetlenül kell hagyni, hogy a vizsgált vegyi anyag beviteléhez használt oldószer elpárologhasson, de meg kell előzni, hogy a toxikus vegyi anyag ezen idő alatt esetleg eltávozzon.

Vízben és szerves oldószerekben rosszul oldódó vegyi anyagok

21. Vízben és szerves oldószerekben rosszul oldódó vegyi anyagok esetén a kívánt vizsgálati koncentráció eléréséhez – a talajhoz hozzáadott teljes homokmennyiség részét képező – kvarchomokot keverünk össze a vizsgált vegyi anyag megfelelő mennyiségével. A kvarchomok és a vizsgált vegyi anyag e keverékét hozzáadjuk az előnedvesített talajhoz, miután alaposan elkevertük megfelelő mennyiségű ioncserélt vízzel ahhoz, hogy a szükséges nedvességtartalmat kialakítsuk. A végtermékként kapott keveréket elosztjuk a vizsgálati edények között. Az eljárást megismételjük minden vizsgálati koncentráció esetében és egy megfelelő kontrollt is készítünk.

A vizsgált vegyi anyag talajfelszínen történő alkalmazása

22. Ha a vizsgált vegyi anyag növényvédő szer, helyénvaló lehet azt a talaj felszínére történő permetezéssel bejuttatni. A talajt az ugróvillások hozzáadása után kezeljük. A vizsgálati tartályokat először megtöltjük a nedvesített talajszubsztrátummal, majd hozzáadjuk az állatokat, és ezután lemérjük a vizsgálati tartályokat. Annak érdekében, hogy elkerüljük az állatok vizsgált vegyi anyaggal való közvetlen érintkezés útján történő expozícióját, a vizsgált vegyi anyagot legalább fél órával az ugróvillások behelyezése után alkalmazzuk. A vizsgált vegyi anyagot – alkalmas laboratóriumi permetező segítségével – lehetőleg egyenletesen kell a talajfelszínen alkalmazni, szimulálva a valós viszonyok közötti permetezést. Az alkalmazást ± 2 °C szórású hőmérsékleti tartományon belül kell végezni, illetve vizes oldatok, emulziók vagy diszperziók esetében vizet a kockázatelemzési ajánlások szerinti arányban kell használni. Az arányt megfelelő kalibrációs technikával kell hitelesíteni. A különleges készítményformákat, úgymint a granulátumokat vagy csávázószereket a mezőgazdasági felhasználással megegyező módon lehet alkalmazni. A táplálékot a permetezés után adjuk hozzá.

ELJÁRÁS

Vizsgálati körülmények

23. A vizsgálat hőmérséklete 20 ± 2 °C-os hőmérsékleti tartományon belül mozoghat, és átlagos hőmérséklete 20 ± 1 °C lehet. A vizsgálatot ellenőrzött világos-sötét ciklusok mellett végezzük (lehetőleg 12 óra világos és 12 óra sötét), a vizsgálati edények területén 400–800 lux megvilágítással.

24. A talajnedvesség ellenőrzése érdekében az edényeket a vizsgálat kezdetén, közepén és végén lemérjük. A 2 %-ot meghaladó tömegveszteséget ionmentesített víz hozzáadásával pótoljuk. Megjegyzendő, hogy a vízveszteség csökkenthető, ha a vizsgálati inkubátorban magas levegő-páratartalmat (> 80 %) tartunk fenn.

25. A pH-t a dózisbehatároló vizsgálat és a meghatározó vizsgálat elején és végén egyaránt meg kell mérni. A méréseket egy extra kontrollmintán és a kezelt talajok egy olyan extra mintáján is el kell végezni (az összes koncentráció esetében), amelyet ugyanúgy készítünk és tartunk fenn, mint a vizsgálati tenyészeteket, de ugróvillásokat nem tartalmaz.

Vizsgálati eljárás és mérések

26. Minden vizsgálati koncentráció esetében 30 g friss tömegnek megfelelő mennyiségű vizsgálati talajt töltünk a vizsgálati edénybe. A vizsgált vegyi

▼M6

anyagot nem tartalmazó vizes kontrollokat is készítünk. Ha hordozót használunk a vizsgált vegyi anyag bevitelére, a vizsgálati sorozat mellett egy hordozót tartalmazó kontrollsorozatot is le kell futtatni. Az oldószer vagy diszpergálószer koncentrációjának meg kell egyeznie a vizsgált vegyi anyagot tartalmazó edényekben használt koncentrációval.

27. Az ugróvillásokat óvatosan tesszük át az edényekbe (az állatokat a vizsgálati edények között véletlenszerűen szétosztva), és a talaj felszínére helyezzük őket. Az állatok hatékony áthelyezéséhez alacsony szívóhatású levegőáramoltató eszközt használhatunk. A vizsgálati koncentrációk és kontrollok ismétléseinek száma az alkalmazott vizsgálati tervtől függ. A vizsgálati edényeket véletlenszerűen helyezzük el a vizsgálati inkubátorban, és az edények pozícióját hetente véletlenszerűen megváltoztatjuk.

28. A *F. fimetariával* végzett vizsgálathoz vizsgálati edényenként húsz felnőtt állatot kell használni, egyenként 10–10 db 23–26 napos hímmel és nősténynyel. A 21. napon az ugróvillásokat kiemeljük a talajból és megszámoljuk. A *F. fimetaria* esetében az ivarokat a vizsgálathoz használt szinkron állatállományban az állatok mérete alapján különböztetjük meg. A nőstények jellegzetesen nagyobbak, mint a hímek (lásd a 3. függeléket).

29. A *F. candida*-val végzett vizsgálatban tíz db 9–12 napos fiatal egyedet kell használni vizsgálati edényenként. A 28. napon az ugróvillásokat kiemeljük a talajból és megszámoljuk.

30. Táplálékforrásként a vizsgálat elején, majd körülbelül két 2 hét múlva megfelelő mennyiségű, pl. 2–10 mg – kereskedelmi forgalomban kapható háztartási célú – granulált szárított sütőélesztőt adunk mindegyik tartályhoz.

31. A vizsgálat végén elemezzük a mortalitást és a szaporodást. Az ugróvillásokat 3 hét (*F. fimetaria*) vagy 4 hét (*F. candida*) múlva kiemeljük a vizsgálati talajból (lásd a 4. függeléket), és megszámoljuk őket (12). Az ugróvillás példány elhullottként kerül rögzítésre, ha nincs jelen a talajból kiemelt állatok között. A kiemelési és számlálási módszert validálni kell. Az érvényességhez a fiatal egyedek kiemelésében 95 %-ot meghaladó hatásfokot kell elérni, amelyet pl. ismert számú példány talajhoz adásával lehet ellenőrizni.

32. A vizsgálati eljárás gyakorlati összefoglalója és ütemezése a 2. függelékben található.

Vizsgálati terv

Dózisbehatároló vizsgálat

33. Szükség esetén dózisbehatároló vizsgálatot végzünk, például a vizsgált vegyi anyag öt koncentrációjával (0,1, 1,0, 10, 100 és 1 000 mg/kg száraz talaj), a kezelések és a kontrollok esetében egyaránt két ismétlésben. A hasonló vegyi anyagokkal végzett vizsgálatokból vagy a szakirodalomból származó, az ugróvillások mortalitására és szaporodására vonatkozó egyéb információk is hasznosak lehetnek a dózisbehatároló vizsgálatban használandó koncentrációtartomány meghatározásakor.

34. A dózisbehatároló vizsgálat időtartama két hét a *F. fimetaria* és 3 hét a *F. candida* esetében, amellyel biztosítható, hogy az ugróvillások nemzzenek egy generációnyi fiatal egyedet. A vizsgálat végén értékeljük az ugróvillások mortalitását és szaporodását. A felnőtt egyedek számát és a fiatal példányok előfordulását fel kell jegyezni.

Meghatározó vizsgálat

35. Az EC_x (például EC_{10}, EC_{50}) kiszámításához tizenkét koncentrációt kell vizsgálni. Minden vizsgálati koncentráció esetében legalább két ismétlés és hat kontrollismétlés bevonása javasolt. A szorzótényező a dózisválasz mintától függően változhat.

▼M6

36. A NOEC/LOEC meghatározásához legalább öt, mértani sorozatba rendezett koncentrációt kell vizsgálni. Minden vizsgálati koncentráció esetében négy ismétlés plusz nyolc kontroll bevonása javasolt. A koncentrációk közötti távolság nem haladhatja meg az 1,8-as szorzótényezőt.

37. Egy kombinált módszer lehetővé teszi mind a NOEC/LOEC, mind az EC^x meghatározását. A kombinált megközelítéshez nyolc, mértani sorozatot alkotó kezelési koncentrációt kell használni. Kezelésenként négy ismétlés plusz nyolc kontroll ajánlott. A koncentrációk közötti távolság nem haladhatja meg az 1,8-as szorzótényezőt.

38. Ha a dózisbehatároló vizsgálat során nem figyelhető meg hatás a legmagasabb (azaz az 1 000 mg/kg-os) koncentráció esetében, a szaporodási vizsgálatot határérték-vizsgálatként lehet elvégezni az 1 000 mg/kg vizsgálati koncentráció és a kontroll használatával. A határérték-vizsgálat lehetőséget biztosít annak igazolására, hogy a határkoncentrációnak nincs statisztikailag szignifikáns hatása. A kezelt talaj és a kontroll esetében egyaránt nyolc ismétlést kell használni.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

39. A fő végpont a szaporodási teljesítmény (pl. a fiatal egyedek száma vizsgálati edényenként). A statisztikai elemzés (például ANOVA eljárások) során Student-féle t-próbával, Dunnett-féle próbával vagy Williams-féle próbával hasonlítjuk össze a kezeléseket. Kiszámítjuk az egyes kezelések átlagának 95 %-os konfidenciaintervallumát.

40. Jelentős érvényességi kritérium a túlélő felnőtt egyedek száma a kezeletlen kontrollokban, ezért azt dokumentálni kell. A dózisbehatároló vizsgálathoz hasonlóan minden egyéb károsodásra utaló jelet fel kell tüntetni a záró jegyzőkönyvben is.

LCx és ECx

41. Az EC_x-értékeket, beleértve a hozzájuk tartozó alsó és felső 95 %-os konfidenciaintervallumokat, a megfelelő statisztikai módszerekkel számítjuk ki (pl. logisztikus vagy Weibull-függvény, csonkolt Spearman–Karber módszer vagy egyszerű interpoláció). Az EC_x-értéket úgy kapjuk meg, hogy a kapott egyenletbe beillesztünk egy értéket, amely megfelel a kontroll átlaga x %-ának. Az EC_{50} vagy bármely más EC_x kiszámításához a teljes adathalmazt regresszióanalízisnek kell alávetni. Az LC_{50}-értéket általában probitanalízissel vagy olyan hasonló elemzéssel becsüljük, amely figyelembe veszi a binomiális eloszlású mortalitási adatokat.

NOEC/LOEC

42. Ha a statisztikai elemzés célja a NOEC/LOEC meghatározása, edényenkénti statisztikákra (az egyes edények ismétlésnek minősülnek) van szükség. Az „Aktuális megközelítések az ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató” című 54. OECD-dokumentum szerinti megfelelő statisztikai módszereket kell alkalmazni (9). A vizsgált vegyi anyag kontrollal összehasonlított káros hatásait általában egyoldali hipotézisvizsgálattal vizsgáljuk ($p \leq 0,05$).

43. A normál eloszlást és a szóráshomogenitást megfelelő statisztikai próbával, pl. a Shapiro–Wilk-féle, illetve a Levene-féle próbával ($p \leq 0,05$) lehet tesztelni. Egyutas varianciaanalízist (ANOVA) és azt követően többszörös

▼M6

összehasonlító próbákat lehet végezni. Többszörös összehasonlításokkal (pl. Dunnett-féle próba) vagy lefelé lépegető trendpróbákkal (pl. Williams-féle próba) lehet kiszámítani, hogy vannak-e jelentős különbségek ($p \leq 0,05$) a kontrollok és a vizsgált vegyi anyag különböző koncentrációi között (az ajánlott próbát az 54. OECD-dokumentum (9) szerint kell kiválasztani). Ellenkező esetben nem parametrikus módszereket (pl. a Holm szerinti Bonferroni-féle U-próbát vagy a Jonckheere–Terpstra trendpróbát) lehet használni a NOEC és a LOEC meghatározására.

Határérték-vizsgálat

44. Ha határérték-vizsgálatot (a kontroll és egyetlen kezelés összehasonlítása) végeztünk, és a parametrikus vizsgálati eljárások előfeltételei (normalitás, homogenitás) teljesülnek, a metrikus válaszokat a Student-féle próba (t-próba) alapján értékelhetjük. Ha a feltételek nem teljesülnek, akkor a nem egyenlő szórásnégyzeteket feltételező t-próba (Welch-féle t-próba) vagy egy nemparaméteres próba, például a Mann–Whitney-féle U-próba alkalmazható.

45. A kontrollok (a kontroll és az oldószeres kontroll) közötti szignifikáns különbség meghatározása céljából az egyes kontrollok ismétléseit a határérték-vizsgálatnál leírtak szerint lehet vizsgálni. Ha ezek a tesztek nem mutatnak ki szignifikáns eltérést, a kontrollok és az oldószeres kontroll ismétléseit össze lehet vonni. Ellenkező esetben az összes kezelést az oldószeres kontrollal kell összehasonlítani.

Vizsgálati jegyzőkönyv

46. A vizsgálati jegyzőkönyvnek legalább a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag

— a vizsgált vegyi anyag azonosítása, tétel- és CAS-száma, tisztasága;

— a vizsgált vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságai (pl. log Kow, vízoldhatóság, gőznyomás, Henry-állandó (H), valamint a vizsgált anyag talajban bekövetkező sorsára vonatkozó esetleges információk), ha rendelkezésre állnak;

— ha nem a tiszta vegyi anyagot vizsgáljuk, meg kell adni a vizsgált vegyi anyag formulázását és az adalékokat;

A vizsgálathoz használt organizmusok

— a faj azonosítása és a vizsgálathoz használt organizmusok szállítója, tenyésztési feltételek és a vizsgálathoz használt organizmusok életkortartományának leírása;

Vizsgálati körülmények

— a vizsgálati terv és eljárás leírása;

— a vizsgálati talaj elkészítésének részletei; részletes leírás, ha természetes talajt használunk (eredet, történet, szemcseméret-eloszlás, pH, szervesanyag-tartalom);

— a talaj víztartó képessége;

— a vizsgált vegyi anyag talajba történő bejuttatásához használt technika leírása;

— vizsgálati körülmények: fényerő, világos-sötét ciklusok időtartama, hőmérséklet;

— az etetési rend leírása, a vizsgálatban használt táplálék típusa és mennyisége, etetési dátumok;

— a talaj pH-ja és víztartalma a vizsgálat kezdetén és végén (kontroll és mindegyik kezelés);

— a kiemelési eljárás részletes leírása és a kiemelés hatásfoka;

▼M6

Vizsgálati eredmények

— a fiatal egyedek vizsgálat végén meghatározott száma az egyes edényekben;

— a felnőtt egyedek száma és mortalitása (%) az egyes edényekben a vizsgálat végén;

— a nyilvánvaló fiziológiai vagy patológiás tünetek, illetve a jól megfigyelhető magatartásbeli változások leírása;

— a referencia-vegyianyaggal kapott eredmények;

— a NOEC/LOEC értékek, a mortalitás LC_x és a szaporodás EC_x értékei (többnyire LC_{50}, LC_{10}, EC_{50} és EC_{10}) a 95 %-os konfidenciaintervallumokkal együtt. A számításhoz használt illesztett modell grafikonja, függvényegyenlete és paraméterei (lásd (9));

— az eredmények értelmezéséhez segítséget nyújtó minden információ és megfigyelés;

— ha hipotézisvizsgálatot végeztünk (9), a tényleges vizsgálat ereje;

— az e vizsgálati módszerben leírt eljárásoktól való eltérés és a vizsgálat során bekövetkezett valamennyi szokatlan esemény;

— a vizsgálat érvényessége;

— a minimális kimutatható különbség a NOEC esetében, ha azt becsüljük.

SZAKIRODALOM

(1) Wiles JA and Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester

(2) ISO (1999) Soil Quality – Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. International Organisation for Standardisation, Geneve

(3) Burges A and Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. London

(4) Petersen H and Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388

(5) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195: 111-118

(6) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330pp (ISBN 0-19-854084-1)

(7) Ulber B (1983) Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgium), 30 August-2 September 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268

(8) E melléklet C.36. fejezete: „Ragadozó atkák *(Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer)* szaporodásának talajban végzett vizsgálata”.

(9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris

(10) Scott-Fordsmand JJ and Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Danish Ministry for the Environment.

▼**M6**

(11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 1256, pp. 66.

(12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Toxic. Appl. Soil Ecol. 7, 201-205

(13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.

(14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In Soil Zoology (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, London, pp. 412-416

(15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a not on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96:138-140.

▼M6

1. függelék

Fogalommeghatározások

E vizsgálati módszerben a következő fogalommeghatározások alkalmazandók (a vizsgálatban a hatáskoncentrációk a vizsgált vegyi anyag tömegének és a vizsgálati talaj száraz tömegének hányadosaként vannak kifejezve):

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

NOEC (észlelhető hatást még nem okozó koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon koncentrációja, amely mellett még nem figyelhető meg hatás. Ebben a vizsgálatban a NOEC-nek megfelelő koncentrációnak adott expozíciós idő alatt a kontrollal összehasonlítva nincs statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$).

LOEC (észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció): a vizsgált vegyi anyag azon legkisebb koncentrációja, amelynek van adott expozíciós idő alatt statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$) a kontrollhoz képest.

ECx (hatáskoncentráció x %-os hatás eléréséhez): az a koncentráció, amely adott expozíciós idő alatt a kontrollal összehasonlítva valamely hatás x %-át okozza a vizsgálati organizmusokban. Például az EC_{50} az a becsült koncentráció, amely a vizsgálat valamilyen végpontja tekintetében a meghatározott expozíciós idő alatt a neki kitett populáció 50 %-ában okoz hatást.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼M6

2. függelék

Az ugróvillás-vizsgálat végrehajtásának főbb lépései és ütemezése

A vizsgálat lépései a következőképpen foglalhatók össze:

Idő (nap)	Lépés
–23-tól –26-ig	A szinkron *F. fimetaria*-tenyészet elkészítése
–14	A mesterséges talaj elkészítése (a száraz alkotóelemek összekeverése) A mesterséges talaj pH-jának ellenőrzése és beállítása szükség szerint A talaj maximális WHC értékének mérése
–9-től –12-ig	A szinkron *F. candida*-tenyészet elkészítése
–2-től –7-ig	A talaj előnedvesítése
–1	A fiatal egyedek több állományra osztása Törzsoldatok készítése és a vizsgált vegyi anyag alkalmazása, ha oldószerre van szükség
0	Törzsoldatok készítése és a vizsgált vegyi anyag alkalmazása, ha szilárd, illetve vízben oldható vegyi anyagról van szó vagy felszíni alkalmazás szükséges. A talaj pH-jának és a tartályok tömegének mérése. Táplálék hozzáadása. Az ugróvillások bejuttatása.
14	Dózisbehatároló vizsgálat a *F. fimetaria* esetében: A vizsgálat befejezése, az állatok kiemelése, a talaj pH-jának mérése és a vízveszteség mérése (tömeg) Meghatározó vizsgálatok: A nedvességtartalom mérése és a víz pótlása, valamint 2–10 mg élesztő hozzáadása
21	Meghatározó *F. fimetaria*-vizsgálat: A vizsgálat befejezése, az állatok kiemelése, a talaj pH-jának mérése és a vízveszteség mérése (tömeg) Dózisbehatároló vizsgálat a *F. candida* esetében: A vizsgálat befejezése, az állatok kiemelése, a talaj pH-jának mérése és a vízveszteség mérése (tömeg)
28	Meghatározó *F. candida*-vizsgálat: A vizsgálat befejezése, az állatok kiemelése, a talaj pH-jának mérése és a vízveszteség mérése (tömeg)

▼M6

3. függelék

Iránymutatás a *F. fimetaria* és a *F. candida* neveléséhez és szinkronizálásához

Az ebben az iránymutatásban megadott időpontokat és időtartamokat minden konkrét ugróvillás törzs esetében ellenőrizni kell, hogy az időzítés révén megfelelő mennyiségű szinkron fiatal egyed jöjjön létre. A petegyűjtés és a szinkron fiatal egyedek gyűjtésének megfelelő napját alapvetően a felnőtt példányok friss tenyésztőközegbe történő átvitelét követő peterakás, illetve a peték kikelése határozza meg.

Javasolt egy pl. 50 tartályból/Petri-csészéből álló állandó törzstenyészetet fenntartani. A törzstenyészet heti etetés, itatás, valamint a régi táplálék és a tetemek eltávolítása révén jól táplált állapotban kell tartani. Ha túl kevés ugróvillás van a tenyésztőközegben, annak a fokozottabb gombanövekedés miatt gátló hatása lehet. A törzstenyészet kifáradhat, ha túl gyakran használják petetermelésre. Az elhullott felnőtt egyedek és a tenyésztőközegen megjelenő penész a fáradtság jele. A szinkron állatok tenyésztése során megmaradt petéket a tenyészet felfrissítésére lehet használni.

A *F. fimetaria* szinkron tenyészetben a hímeket elsősorban a méretük alapján lehet megkülönböztetni a nőstényektől. A hímek egyértelműen kisebbek, mint a nőstények, és a hímek gyorsabban mozognak a nőstényeknél. Az állatok ivarok szerinti helyes kiválasztása kis gyakorlást igényel, és megerősíthető az ivarszervek területének mikroszkópos vizsgálatával (13).

1. **Nevelés**

1.a. *A tenyésztőközeg elkészítése*

A tenyésztőközeg gipsz (kalcium-szulfát) aktív faszénnel. Ez egy nedves közeget biztosít, a faszén funkciója pedig az, hogy megkösse a gázokat és a salakanyagokat (14) (15). A faszenet különböző alakokban lehet alkalmazni az ugróvillások megfigyelésének megkönnyítésére. Porított faszenet használunk például a *F. candida* és *F. fimetaria* esetében (amellyel fekete/szürke gipszet kapunk):

A tenyésztőközeg összetevői:

— 20 ml aktív faszén

— 200 ml desztillált víz

— 200 ml gipsz

vagy

— 50 g porított aktív faszén

— 260–300 ml desztillált víz

— 400 g gipsz.

A közeghez használt keveréket használat előtt állni hagyjuk.

1.b. *Tenyésztés*

Az ugróvillásokat tartályokban – például Petri-csészékben (90 mm × 13 mm) – tartjuk, amelyek alját a tenyésztőközeg 0,5 cm-es rétege fedi. A tenyésztési hőmérséklet 20 ± 1 °C, a világos-sötét ciklus 12–12 óra (400–800 lux). A tartályokat mindenkor nedvesen tartjuk, hogy a bennük lévő levegő relatív páratartalma 100 % legyen. Ez úgy biztosítható, ha szabad víz van a porózus gipszben, de el kell kerülni, hogy összefüggő vízréteg alakuljon ki a gipsz felületén. A vízveszteség úgy előzhető meg,

▼M6

hogy párás külső levegőt biztosítunk. A tartályokból az elpusztult egyedeket, valamint a penészes táplálékot el kell távolítani. A peterakás ösztönzése érdekében a felnőtt állatokat át kell tenni újonnan előállított gipsz/faszén tenyésztőközeget tartalmazó Petri-csészékbe.

1.c. *Táplálékforrás*

A granulált szárított sütőélesztő az egyedüli táplálékforrás az *F. candida* és a *F fimetaria* esetében egyaránt. A gombaképződés elkerülése érdekében hetente egyszer vagy kétszer biztosítunk friss táplálékot. A táplálékot közvetlenül a gipszre helyezzük egy kis halomban. Az állatoknak adott sütőélesztő mennyiségét az ugróvillás-populáció méretéhez kell igazítani, de általában 2–15 mg elegendő.

2. **Szinkronizálás**

A vizsgálatot szinkron állatokkal kell végezni, hogy ugyanolyan stádiumú és méretű homogén vizsgálati állatokat tudjunk használni. A szinkronizálás révén továbbá 3 hetes koruktól kezdődően megkülönböztethetők egymástól a *F. fimetaria* hímek és nőstények az ivari kétalakúság miatt létrejövő méretbeli különbségek alapján. Az alábbiakban egy javasolt eljárást mutatunk be a szinkron állatok létrehozására (a gyakorlati lépések nem kötelező jellegűek).

2.a. *Szinkronizálás.*

— Készítsünk elő 0,5 cm vastag gipsz-faszén tenyésztőközeget tartalmazó tartályokat.

— A törzstenyészet 4–8 hetes tenyésztőközeget tartalmazó legjobb 15–20 tartályából peterakás céljából tegyünk át a tartályokba 150–200 felnőtt *F. fimetaria* és 50–100 *F. candida* egyedet, és adjunk az állatoknak 15 mg élesztőt. Ne tegyünk át a felnőttekkel együtt fiatal példányokat, mivel a fiatal egyedek jelenléte gátolhatja a petetermelést.

— Tartsuk a tenyészetet 20 ± 1 °C-on (az átlagos hőmérséklet 20 °C legyen), a világos-sötét ciklus pedig 12–12 óra (400–800 lux) legyen. Gondoskodjunk arról, hogy friss táplálék álljon rendelkezésre és a levegő vízzel telített legyen. A táplálék hiánya ahhoz vezethet, hogy az állatok a petékre ürítenek, amelynek következtében gombák szaporodhat el a petéken, illetve a *F. candida* ilyen esetben megeheti saját petéit. 10 nap múlva tűvel és spatulával óvatosan gyűjtsük össze a petéket és tegyük őket „petepapírra” (gipsz-faszén szuszpenzióba mártott kis szűrőpapír-darabokra), majd helyezzünk őket egy friss gipsz/faszén tenyésztőközeget tartalmazó tartályba. Adjunk pár szem élesztőt a tenyésztőközeghez, amely odavonzza a fiatal példányokat, így azok elhagyják a petepapírt. Fontos, hogy a petepapír és a tenyésztőközeg nedves legyen, máskülönben a peték kiszáradnak. Alternatív megoldásként a kifejlett állatokat 2 vagy 3 napos peterakás után is el lehet távolítani a szinkronizáló tenyésztődobozokból.

— Három nap múlva a petepapíron lévő legtöbb pete kikel, és a petepapír alatt is lehet esetleg néhány fiatal egyed.

— Annak érdekében, hogy megegyező korú fiatal egyedek álljanak rendelkezésre, a petepapírt a ki nem kelt petékkel együtt csipesszel eltávolítjuk a Petri-csészéből. A fiatal, ekkor 0–3 napos példányok az edényben maradnak, és élesztővel etetjük őket. A ki nem kelt petéket kidobjuk.

— A petéket és a kikelt fiatal egyedeket ugyanolyan módon tenyésztjük, mint a felnőtteket. Az *F. fimetaria* esetében különösen az alábbi intézkedéseket kell tenni: megfelelő mennyiségű friss táplálékot kell biztosítani, a régi, penészedő táplálékot el kell távolítani, 1 hét után a fiatal egyedeket szét kell osztani új Petri-csészékbe, feltéve, hogy az egyedsűrűség meghaladja a 200-at.

▼M6

2.b. *Az ugróvillások kezelése a vizsgálat kezdetén*

— A 9–12 napos *F. candida* vagy 23–26 napos *F. fimetaria* egyedeket összegyűjtjük (pl. szívással), és egy nedves gipsz-faszén tenyésztőközeget tartalmazó kis tartályban szabadon engedjük, majd pedig binokuláris mikroszkóp alatt ellenőrizzük a fizikai állapotukat (a sérült és károsodott állatokat eltávolítjuk). Minden lépést úgy kell végrehajtani, hogy közben az ugróvillásokat – a szárazság okozta stressz elkerülése érdekében – nedves környezetben tartjuk, pl. nedvesített felületek, stb. használatával.

— Fordítsuk a tartályt fejjel lefelé és ütögessük meg, hogy az ugróvillásokat átmozgassuk a talajba. A statikus elektromosságot semlegesíteni kell, különben az állatok csak a levegőbe repülnek, vagy a vizsgálati tartály oldalára tapadnak és kiszáradnak. A semlegesítéshez ionizálót vagy a tartály alá helyezett nedves ruhát használhatunk.

— A táplálékot a talaj teljes felszínén szét kell teríteni, nem szabad egy kupacban lerakni.

— A szállítás és a vizsgálati időszak alatt el kell kerülni a vizsgálati tartályok ütögetését és az egyéb fizikai behatásokat, mivel az fokozhatja a talaj tömörödését, és akadályozhatja az ugróvillások közötti interakciót.

3. **Alternatív ugróvillás fajok**

Az e vizsgálati módszer szerinti vizsgálathoz egyéb ugróvillás fajokat is lehet választani, például a *Proisotoma minuta, Isotoma viridis, Isotoma anglicana, Orchesella cincta, Sinella curviseta, Paronychiurus kimi, Orthonychiurus folsomi, Mesaphorura macrochaeta* nevű fajokat. Az alternatív fajok használata előtt számos előfeltételt kell teljesíteni, így:

— A fajt egyértelműen azonosítani kell;

— A faj kiválasztását meg kell indokolni;

— Biztosítani kell, hogy a vizsgálati fázis magában foglalja a reproduktív biológiát is, hogy az is az expozíció potenciális célpontja legyen;

— Ismerni kell a faj életciklusát: ivarérettségi kor, petefejlődés időtartama, az expozíciónak kitett lárvastádium;

— A vizsgálati közegnek és a táplálékforrásnak optimális körülményeket kell biztosítania a növekedéshez és a szaporodáshoz;

— A változékonyságnak elég alacsonynak kell lennie a toxicitás precíz és pontos becsléséhez.

▼M6

4. függelék

Az állatok kiemelése és számlálása

1. **A kiemelést két módszerrel lehet végezni.**

1.a. Első módszer: Használhatunk MacFadyen elvein alapuló szabályozott hőmérsékleti gradiensű extraktort (1). A hő az extrakciós doboz tetején található fűtőelemből érkezik (a talajminta felületére helyezett termisztor szabályozza). A gyűjtőedényt körülvevő hűtött folyadék hőmérsékletét a gyűjtődoboz felszínén található termisztor szabályozza (a talaj magja alatt elhelyezve). A termisztorok egy programozható vezérlőegységhez csatlakoznak, amely egy előre programozott ütemterv szerint emeli a hőmérsékletet. Az állatokat a hűtött gyűjtődobozban gyűjtjük (2 °C), amelynek alján gipsz-faszén réteg található. Az extrakciót 25 °C-on kezdjük, majd a hőmérsékletet 12 óránként 5 °C-kal automatikusan megemeljük. Az extrakció teljes időtartama 48 óra. Az extrakciót 12 óra elteltével 40 °C-on fejezzük be.

1.b. Második módszer: A fiatal ugróvillások számát a kísérleti inkubációs idő eltelte után flotáció útján mérjük. Ehhez a vizsgálatot körülbelül 250 ml térfogatú edényekben végezzük. A vizsgálat végén kb. 200 ml desztillált vizet adunk az edényhez. A talajt egy finom ecsettel óvatosan megmozgatjuk, hogy az ugróvillások felemelkedjenek a víz felszínére. A számolás megkönnyítésére kis mennyiségű (kb. 0,5 ml) fekete Kentmere fényképészeti festéket adhatunk a vízhez, amely növeli a víz és a fehér ugróvillások közötti kontrasztot. A festék az ugróvillások számára nem mérgező.

2. **Számlálás:**

A számlálás szabad szemmel vagy fénymikroszkóp alatt végezhető a lebegtető edény fölé helyezett rács segítségével, vagy úgy, hogy lefényképezzük az edények felszínét, és az ugróvillásokat a kinagyított és kinyomatott vagy kivetített fényképen számoljuk meg. A számlálás digitális képfeldolgozási technikák segítségével is elvégezhető (12). Minden technikát validálni kell.

▼**M6**

5. függelék

A talaj maximális WHC értékének meghatározása

A talaj maximális víztartó képességének (WHC) meghatározására az alábbi módszer találták megfelelőnek. A módszert az ISO DIS 11268-2 C. melléklete (Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földigilisztákra (*Eisenia fetida*). 2. rész: A szaporodásra kifejtett hatások meghatározása) írja le.

Alkalmas mintavevő eszköz (csigás cső stb.) használatával gyűjtsünk össze meghatározott mennyiségű (pl. 5 g) vizsgálati talajt. Fedjük le a cső alját egy darab nedves szűrőpapírral és helyezzük egy vízfürdőben elhelyezett keretre. A csövet fokozatosan kell a vízbe meríteni, amíg a víz szintje a talaj szintje fölé nem emelkedik. Ezután a csövet körülbelül három órán át a vízben kell hagyni. Mivel a talaj kapillárisai nem tudják az összes felszívott vizet megtartani, hagyni kell, hogy a talajminta lecsöpögjön, mégpedig úgy, hogy a csövet egy lefedett edényben (mellyel a kiszáradást előzzük meg) két órára finomra őrölt, nagyon nedves kvarchomok-ágyra tesszük. A mintát ezután 105 °C-on tömegállandóságig szárítjuk és mérjük. A víztartó képességet (WHC) a következő módon kell kiszámítani:

$$\text{WHC (a száraz tömeg \% – ában)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Ahol:

S = a vízzel telített talaj + a cső tömege + a szűrőpapír tömege

T = tára (a cső tömege + a szűrőpapír tömege)

D = a talaj száraz tömege

▼**M6**

6. függelék

A talaj pH-értékének meghatározása

A talaj pH-értékének meghatározására szolgáló alábbi módszer az ISO DIS 10390: Talajminőség. A pH meghatározása című szabványban szereplő leíráson alapul.

Meghatározott mennyiségű talajt szobahőmérsékleten legalább 12 órán át szárítunk. Ezután legalább 5 gramm talajt tartalmazó, a talaj térfogatának ötszörösére hígított talajszuszpenziót készítünk 1 mólos analitikai tisztaságú kálium-klorid (KCl) vagy 0,01 mólos analitikai tisztaságú kalcium-klorid ($CaCl_2$) oldattal. A szuszpenziót ezután öt percig alaposan összerázzuk, majd legalább 2, de legfeljebb 24 órán keresztül ülepedni hagyjuk. Ezután a folyékony fázis pH-ját megmérjük egy pH-mérővel, amelyet minden mérés előtt pufferoldatok megfelelő sorozatával (például pH = 4,0 és 7,0) kalibrálunk.

▼M6

C.40. **ÁRVASZÚNYOGOK ÉLETCIKLUSÁRA HATÓ TOXICITÁS VIZSGÁLATA ÜLEDÉK-VÍZ RENDSZERBEN, SZENNYEZETT VÍZ VAGY SZENNYEZETT ÜLEDÉK HASZNÁLATÁVAL**

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 233. vizsgálati iránymutatásában (2010) leírt módszerrel. A vizsgálat célja a vegyi anyagoknak való élethosszig tartó expozíció hatásának felmérése a *Chironomus* fajokba tartozó édesvízi kétszárnyúak esetében, teljesen lefedve az 1. generációt (P generáció) és a 2. generáció (F1 generáció) korai életszakaszát. A vizsgálat a meglévő C.28 (1) vagy C.27 (15) vizsgálati módszert szennyezett vizre, illetve szennyezett üledékre alapuló expozíciós forgatókönyvvel bővíti. A vizsgálat figyelembe veszi a *Chironomus riparius* és a *Chironomus dilutus* (korábbi nevén *C. tentans* (2)) fajokkal végzett meglévő toxicitási vizsgálati protokollokat, amelyeket Európában és Észak-Amerikában dolgoztak ki (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9), majd ezt követően körvizsgálatok keretében ellenőriztek (1) (7) (10) (11) (12). Egyéb olyan árvaszúnyog fajok is használhatók, amelyekről a szakirodalomban megfelelő mennyiségű információ áll rendelkezésre, így például a *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Az expozíció teljes időtartama kb. 44 nap a *C. riparius* és a *C. yoshimatsui* esetében, és kb. 100 nap a *C. dilutus* esetében.

2. A vizsgálati módszer leírja mind a víz-, mind az üledékexpozíciós forgatókönyvvel végzett vizsgálatokat. A megfelelő expozíciós forgatókönyv a vizsgálat rendeltetési céljától függ. A vízben való expozíción alapuló forgatókönyv, amelyben a vízoszlopot szennyezzük, a növényvédő szerek permetezéssel történő vízbe jutását hivatott szimulálni, és a felszíni vizekben mérhető kezdeti csúcskoncentrációkra terjed ki. A víz szennyezése egyéb típusú expozíciók vizsgálata esetén is hasznos (beleértve a vegyi anyagok kiömlését), de nem alkalmas az üledékben történő felhalmozódási folyamatok vizsgálatára, amelyek a vizsgálat időtartamánál hosszabb ideig tartanak. Ehhez, és olyan esetek vizsgálatakor, amikor a növényvédő szerek fő belépési útvonala a vizekbe a bemosódás, a szennyezett üledéket alkalmazó forgatókönyv megfelelőbb lehet. Ha egyéb expozíciós forgatókönyvek vizsgálata a cél, a vizsgálati terv könnyen adaptálható. Például ha nem fontos a vizsgált vegyi anyag eloszlása a vizes fázis és az üledékréteg között, illetve az üledékhez történő adszorpciót minimalizálni kell, számításba lehet venni valamilyen helyettesítő mesterséges üledék (pl. kvarchomok) használatát.

3. Az olyan vegyi anyagok, amelyek az üledékben élő organizmusok vizsgálatát teszik szükségessé, hosszú időn keresztül megmaradhatnak az üledékben. Az üledéklakó organizmusok többféle módon lehetnek kitéve ezeknek az anyagoknak. Az egyes expozíciós útvonalak viszonylagos fontossága, illetve az az időtartam, amely alatt az egyes expozíciós útvonalak képesek a teljes toxikus hatáshoz hozzájárulni, a vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól függ. Az erősen adszorbeálódó vagy az üledékbe kovalens kötéssel beépülő vegyi anyagok esetében fontos expozíciós útvonal lehet a szennyezett táplálék felvétele. Annak érdekében, hogy elkerüljük az erősen lipofil vegyi anyagok toxicitásának alulbecslését, megfontolandó, hogy a vizsgált vegyi anyaggal való szennyezést megelőzően táplálékot keverjünk az üledékbe (lásd a 31. pontot). Így minden expozíciós útvonalat és minden életszakaszt be lehet vonni a vizsgálatba.

4. A mért végpontok a következők: a kifejlett felnőtt egyedek száma (az 1. és a 2. generáció esetében egyaránt), a fejlődési sebesség (az 1. és a 2. generáció esetében egyaránt), az ivararány a teljes mértékben kifejlett és élő felnőtt egyedek körében (az 1. és a 2. generáció esetében egyaránt), a petecsomók száma nőstényenként (csak az 1. generáció esetében) és a petecsomók termékenysége (csak az 1. generáció esetében).

5. Kifejezetten ajánlott a formulázott üledék használata. A formulázott üledék számos előnnyel rendelkezik a természetes üledékkel szemben:

▼M6

— a kísérlet variabilitása kisebb, mivel a mesterséges üledék egy reprodukálható „szabványosított közeget” biztosít, és nem kell szennyezésmentes, tiszta üledéket keresni;

— a vizsgálatot bármikor el lehet kezdeni anélkül, hogy szezonális eltéréseket tapasztalnánk a vizsgálati üledékben, és nincs szükség az üledék előkezelésére sem az üledékben természetes módon eleve előforduló fauna eltávolításához;

— a rutinvizsgálathoz szükséges mennyiség helyszíni gyűjtéséhez viszonyítva a költségek alacsonyabbak;

— a formulázott üledék lehetővé teszi a különböző vizsgálatokban megfigyelt toxicitás összehasonlítását és a vegyi anyagok ennek megfelelő rangsorolását (3).

6. A leírásban használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

7. Első fejlődési stádiumban lévő árvaszúnyoglárvákat teszünk ki a vizsgált vegyi anyag különböző koncentrációinak egy üledék-víz rendszerben. A vizsgálatot az első fejlődési stádiumban lévő lárvák (1. generáció) szennyezett üledéket tartalmazó vizsgálati főzőpoharakba helyezésével kezdjük, vagy alternatív megoldásként a vizet szennyezzük a vizsgált vegyi anyaggal, miután a lárvákat a főzőpohárba tettük. Értékeljük az árvaszúnyogok kikelését, a kikelésig eltelt időt, valamint az ivarok arányát a kifejlett és életben lévő szúnyogok között. A kikelt felnőtt egyedeket a rajzás, párzás és peterakás megkönnyítése érdekében tenyésztőketrecekbe helyezzük át. Értékeljük a lerakott petecsomók számát és termékenységét. Ezekből a petecsomókból nyerjük a 2. generáció első fejlődési stádiumban lévő lárváit. A lárvák frissen előkészített vizsgálati főzőpoharakba kerülnek (a szennyezési eljárás megegyezik az 1. generációnál alkalmazottal), hogy a kikelés, a kikelésig eltelt idő, valamint a kifejlett és életben lévő szúnyogok ivararányának felmérése segítségével meghatározzuk a 2. generáció életképességét (az életciklus-vizsgálat vázlatos bemutatása az 5. függelékben található). Az adatokat regressziós modellel elemezzük a vonatkozó végpontot X %-kal csökkentő koncentráció becsléséhez, vagy hipotézisvizsgálatot végzünk az észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC) megállapítása céljából. Utóbbi esetben szükség van a kezelésre adott válaszok és a megfelelő kontrollválaszok statisztikai próbákkal történő összehasonlítására is. Megjegyzendő, hogy a szennyezett vizes forgatókönyvben gyorsan lebomló vegyi anyagok esetén az egyes generációk későbbi életszakaszai (pl. báb fázis) során az állatok lényegesen alacsonyabb koncentrációszintnek lehetnek kitéve a fedővízben, mint az első fejlődési stádiumban lévő lárvák. Ha ez problémát jelent, mivel hasonló expozíciós szintre van szükség minden életszakaszban, a vizsgálati módszer az alábbiak szerint módosítható:

— párhuzamos vizsgálatsorozat végzése különböző életszakaszokban történő szennyezéssel, vagy

— a vizsgálati rendszer ismételt szennyezése (vagy a fedővíz cseréje) mindkét vizsgálati fázisban (1. és 2. generáció), amelyhez a szennyezési (megújítási) időközöket a vizsgált vegyi anyag lebomlási jellemzőihez igazítjuk.

Ezek a módosítások csak a szennyezett vizes forgatókönyvben alkalmazhatók, a szennyezett üledékes forgatókönyvben nem.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

8. Ismerni kell a vizsgált vegyi anyag vízoldékonyságát, gőznyomását és log K_{ow}-értékét, mért vagy számított megoszlását az üledékben, valamint a stabilitását vízben és üledékben. Rendelkezésre kell állnia egy megbízható analitikai módszernek a vizsgált vegyi anyag mennyiségi meghatározásához a fedővízben, a pórusvízben és az üledékben, amelynek pontossága

▼M6

és kimutatási határa ismert és dokumentált. Hasznos információ a vizsgált vegyi anyag szerkezeti képlete és kémiai tisztasága. A vizsgált vegyi anyag kémiai sorsára (pl. szétterjedés, abiotikus és biotikus lebomlás, stb.) vonatkozó információk is hasznosak. A vizsgálat elvégzését megnehezítő fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkező vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozóan a szakirodalom (16) nyújt további tájékoztatást.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

9. Rendszeres időközönként referencia-vegyianyagokat is lehet vizsgálni annak ellenőrzésére, hogy a laboratóriumi populáció érzékenysége nem változott. A vízibolhákhoz hasonlóan elegendő lehet egy 48 órás akut vizsgálatot végezni (a 17. pontban hivatkozott szakirodalom szerint). Addig azonban, amíg nem áll rendelkezésre validált akut vizsgálati iránymutatás, az e melléklet C.28 fejezete szerinti krónikus vizsgálatot lehet megfontolni. A körvizsgálatokban és a validációs vizsgálatokban sikeresen alkalmazott referencia-mérgezőanyagok közé tartozik például a lindán, a trifluralin, a fenol, a kadmium-klorid és a kálium-klorid. (1) (3) (6) (7) (18).

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

10. A vizsgálat érvényességéhez az alábbi feltételeknek kell teljesülniük:

— a kontrollkezelésben az átlagos kikelési aránynak az expozíciós idő végén legalább 70 %-nak kell lennie mindkét generációban (1) (7);

— a *C. riparius* és a *C. yoshimatsui* esetében a kontrollkezelésben kikelt összes felnőtt szúnyog 85 %-ának mindkét generációban 12–23 nappal az első fejlődési stádiumban lévő lárvák edényekbe helyezése után kell megjelennie; a *C. dilutus* esetében a 20–65 napos időtartam fogadható el;

— a kontrollkezelésben az ivarok átlagos arányának a kifejlett, élő felnőtt egyedek körében (nőstény vagy hím frakcióként) mindkét generációban legalább 0,4-nek kell lennie, de nem haladhatja meg a 0,6-et;

— az 1. generáció kontrolljaiban a petecsomók tenyésztőketrecenkénti számának a tenyésztőketrecbe helyezett nőstények számára vetítve legalább 0,6-nek kell lennie;

— az 1. generáció kontrolljaiban a termékeny petecsomók arányának minden tenyésztőketrecben legalább 0,6-nek kell lennie;

— az expozíciós idő végén mindkét generáció esetében meg kell mérni a pH-t és az oldott oxigén koncentrációját az összes edényben. Az oxigénkoncentrációnak minden vizsgálati edényben el kell érnie a levegőtelítettségi érték (ASV ([1])) 60 %-át, a fedővíz pH-jának pedig 6 és 9 között kell lennie;

— a víz hőmérséklete legfeljebb ± 1,0 °C-kal változhat.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Vizsgálati edények és tenyésztőketrecek

11. A lárvák expozíciójához 600 ml űrtartalmú és kb. 8,5 cm átmérőjű üveg főzőpoharakat használunk (lásd az 5. függeléket). Amennyiben biztosított az üledék és a fedővíz megfelelő mélysége, ettől eltérő edények is alkalmazhatók. Lárvánként 2–3 cm^2 nagyságú üledékfelületet kell biztosítani. Az üledékréteg és a fedővíz mélységének aránya kb. 1:4 legyen. A tetején

([1]) 20 °C-on és normál légköri nyomáson az édesvíz ASV-értéke 9,1 mg/l (a 60 % 5,46 mg/l értéknek felel meg)

▼M6

és minimum az egyik oldalán gézzel (lyukbőség: körülbelül 1 mm) lefedett tenyésztőketreceket (mindhárom irányban legalább 30 cm) kell használni (lásd az 5. függeléket). A peterakás céljára minden ketrecbe vizsgálati vizet és üledéket tartalmazó, 2 l űrtartalmú kristályosító csészét helyezünk. Az üledékréteg és a fedővíz mélységének aránya a kristályosító csésze esetében is kb. 1:4 legyen. A petecsomók a kristályosító csészéből történő begyűjtés után egy 12-lyukú mikrotiterlemezre kerülnek (lyukanként egy szalag; minden lyuk legalább 2,5 ml vizet tartalmaz a szennyezett kristályosító edényből), majd a lemezeket egy fedővel lefedjük, hogy megakadályozzuk a jelentős mértékű párolgást. A petecsomók tartására egyéb alkalmas edények is használhatók. A mikrotiterlemezeken kívül minden vizsgálati tartálynak és a vizsgált rendszerrel érintkezésbe kerülő egyéb berendezésnek teljes mértékben üvegből vagy más, kémiailag semleges anyagból kell készülniük (pl. politetrafluor-etilénből).

A faj kiválasztása

12. A vizsgálatot lehetőleg a *Chironomus riparius* fajjal kell végezni. A *C. yoshimatsui* faj is használható. A *C. dilutus* is megfelelő, de nehezebben kezelhető, és hosszabb vizsgálati időszakot igényel. A *C. riparius* tenyésztésének módját a 2. függelék ismerteti részletesen. A tenyésztési körülményekre vonatkozó információ a *C. dilutus* (5) és a *C. yoshimatsui* (14) tekintetében is rendelkezésre áll. A vizsgálat megkezdése előtt ellenőrzésképpen fajmeghatározást kell végezni, de ha a példányok saját tenyészetből származnak, akkor ezt nem szükséges minden vizsgálat előtt megtenni.

Üledék

13. Lehetőleg formulázott üledéket (más néven kevert, mesterséges vagy szintetikus üledéket) kell használni. Ha azonban mégis természetes üledéket használunk, akkor azt jellemezni kell (legalább a pH-t és a szerves széntartalmat meg kell határozni, de más paraméterek, például a C/N arány és a szemcseméret-eloszlás vizsgálata is ajánlott), és mentesnek kell lennie mindenféle szennyeződéstől, valamint az árvaszúnyog-lárvákkal versengő vagy az azt fogyasztó egyéb organizmusoktól. Az üledéket a vizsgálat előtt ajánlott hét napig vizsgálati körülmények között kondicionálni. A következő – az (1) szakirodalmi hivatkozásban leírt – formulázott üledék használata ajánlott (1) (20) (21):

a. 4–5 % (száraz tömeg) tőzeg: a lehető legközelebb a pH = 5,5–6,0 értékhez; a tőzeget finomra őrölt por formájában kell használni (részecskeméret ≤ 1 mm), és csak levegőn szárított tőzeg használható;

b. 20 % (száraz tömeg) kaolinagyag (lehetőleg 30 % feletti kaolinittartalommal);

c. 75–76 % (száraz tömeg) kvarchomok (túlnyomórészt finom homok, amely részecskéinek több mint 50 %-a 50 és 200 μm közötti szemcsemérettel rendelkezik);

d. Annyi ioncserélt víz, amennyi ahhoz szükséges, hogy végtermékként 30–50 % nedvességtartalmú keveréket kapjunk;

e. A végtermékként kapott üledékkeverék pH-jának 7,0 ± 0,5 értékre történő beállításához szükséges mennyiségű vegytiszta minőségű kalcium-karbonát ($CACO_3$);

f. A végtermékként kapott keveréknek 2 % (± 0,5 %) szerves széntartalommal kell rendelkeznie, amelyet az a) és c) pont szerinti megfelelő mennyiségű tőzeg és homok hozzáadásával kell beállítani.

14. A tőzegnek, a kaolinagyagnak és a homoknak ismert forrásból kell származnia. Ellenőrizni kell, hogy az üledék összetevőiben előfordulnake kémiai szennyeződések (például nehézfémek, szerves klórvegyületek,

▼M6

szerves foszforvegyületek). A 3. függelék példával szemlélteti a formulázott üledék elkészítését. A száraz összetevők összekeverése is elfogadott, amennyiben bizonyítható, hogy a fedővíz hozzáadását követően az üledék nem esik szét összetevőire (például a vízben lebegő tőzegrészecskékre), és a tőzeget vagy az üledéket megfelelően kondicionáltuk.

Víz

15. Az elfogadható hígítóvíz 2. és 4. függelékben felsorolt kémiai tulajdonságaival rendelkező bármely víz alkalmas a vizsgálathoz. Tenyésztővízként és vizsgálati vízként bármely alkalmas víz, természetes víz (felszíni vagy talajvíz), mesterséges víz (lásd a 2. függeléket) vagy klórtalanított csapvíz elfogadható, amelyben az árvaszúnyoglárvák a tenyésztés és a vizsgálat időszaka alatt életben maradnak anélkül, hogy stressz jeleit mutatnák. A vizsgálat kezdetén a vizsgálathoz alkalmazott víz pH-értékének 6 és 9 között kell lennie, összes keménysége pedig nem haladhatja meg a 400 mg $CaCO_3$/l értéket. Ennél lágyabb vizet kell azonban alkalmazni akkor, ha gyanítható, hogy a keménységet okozó ionok és a vizsgált vegyi anyag között kölcsönhatás alakul ki (ezért ebben az esetben az Elendt-féle M4 közeg nem alkalmazható). Ugyanazt a víztípust kell használni a vizsgálat teljes időtartama alatt. A 4. függelékben felsorolt vízminőségi jellemzőket évente legalább kétszer meg kell mérni, illetve minden olyan alkalommal, amikor fennáll a gyanúja annak, hogy e jellemzők jelentős mértékben megváltoztak.

Törzsoldatok: szennyezett víz

16. a. A vizsgálathoz használt koncentrációk kiszámítása a vízoszlopban – azaz az üledék feletti vízrétegben – mérhető koncentrációk alapján történik. A kiválasztott koncentrációk vizsgálathoz használt oldatait általában egy törzsoldat hígításával készítjük el. A törzsoldatokat lehetőség szerint a vizsgált vegyi anyagnak a vizsgálathoz használt vízben való feloldásával kell elkészíteni. Egyes esetekben oldószer vagy diszpergálószer használatára lehet szükség a megfelelő töménységű törzsoldat előállításához. Alkalmas oldószerek például a következők: aceton, etilénglikol-monoetiléter, etilénglikol-dimetiléter, dimetilformamid és trietilén-glikol. A felhasználható diszpergálószerek: Cremophor RH40, Tween 80, metilcellulóz (0,01 %-os) és HCO-40. Az oldódást segítő szer csak minimális (azaz ≤ 0,1 ml/l) koncentrációban lehet jelen a végtermékként kapott, vizsgálathoz használandó közegben, és minden kezeléshez ugyanazt a szert kell használni. Amennyiben oldódást segítő szert alkalmazunk, annak nem lehet jelentős hatása a túlélési arányra, amit egy negatív (vizes) kontrollal összehasonlított oldószeres kontrollal lehet igazolni. Az ilyen anyagok használatát azonban lehetőség szerint kerülni kell.

Törzsoldatok: szennyezett üledék

16. b. A kiválasztott koncentrációjú szennyezett üledéket általában úgy készítjük el, hogy a vizsgált vegyi anyag oldatát közvetlenül az üledékhez adjuk. A vizsgált vegyi anyag ioncserélt vízben oldott törzsoldatát hengerszék vagy tápkeverő segítségével, vagy pedig kézzel keverjük el a mesterséges üledékkel. Ha a vizsgált vegyi anyag rosszul oldódik vízben, akkor a lehető legkisebb mennyiségű, célnak megfelelő szerves oldószerben (például hexán, aceton vagy kloroform) lehet feloldani. Ezt követően a kapott oldatot vizsgálati edényenként 10 g finom kvarchomokkal keverjük el. Az oldószert hagyjuk elpárologni, mivel azt teljes egészében el kell távolítani a homokból; a homokot ezután összekeverjük a megfelelő mennyiségű üledékkel. A vizsgált vegyi anyag oldódásának megkönnyítéséhez, diszpergálásához vagy emulgeálásához csak gyorsan párolgó szer használható. Nem szabad elfelejteni, hogy az üledék elkészítése során a vizsgált vegyi anyag és a homok keverékéből származó homokot is figyelembe kell

▼M6

venni (azaz az üledéket kevesebb homokkal kell elkészíteni). Biztosítani kell az üledékhez adott vizsgált vegyi anyag egyenletes eloszlását az üledékben. A homogenitás fokát szükség esetén részminták analizálásával kell meghatározni.

VIZSGÁLATI TERV

17. A vizsgálati terv a vizsgálat során alkalmazott koncentrációk számának és osztásközének, az egyes koncentrációkhoz használt edények számának, a lárvák edényenkénti számának, valamint a kristályosító csészék és tenyésztőketrecek számának megválasztását jelenti. Az EC_x és NOEC becslésének, valamint a határérték-vizsgálat tervét az alábbiakban ismertetjük.

A regresszióanalízis megtervezése

18. A vizsgálatnak le kell fednie a hatáskoncentrációt (ECx) és azt a koncentrációtartományt, amelyben a vizsgált vegyi anyag hatása releváns, hogy a végpontot ne kelljen a keletkezett adatok határain kívül extrapolálni. El kell kerülni a jóval a legalsó koncentráció alatti vagy a jóval a legmagasabb koncentráció feletti extrapolációt. A C.27. vagy C.28. vizsgálati módszer szerinti előzetes dózisbehatároló vizsgálat hasznos segítséget nyújthat a megfelelő vizsgálati koncentrációtartomány kiválasztásában.

19. Az EC_x értékének pontosításához legalább öt koncentráció és minden koncentráció esetében nyolc ismétlés szükséges. Minden koncentráció esetében két tenyésztőketrecet kell használni (A és B). A nyolc ismétlést két négy ismétlésből álló csoportra kell osztani, amelyeket egy-egy tenyésztőketrechez kell rendelni. Az ismétlések egyesítésére azért van szükség, hogy elérhető legyen a megfelelő reprodukciós értékeléshez szükséges szúnyogszám a ketrecekben. Ugyanakkor a 2. generációban ismét nyolc ismétlés lesz, amelyeket a tenyésztőketrecekben expozíciónak kitett populációból kell képezni. Minden soron következő koncentráció legfeljebb az előző kétszerese lehet (kivételt képeznek azok az esetek, amikor a dózisválasz görbéje lapos). Az eltérő választ kiváltó vizsgálati koncentrációk számának emelése esetén az egyes kezeléseknél alkalmazott ismétlésszám hatra csökkenthető (tenyésztőketrecenként három). Az ismétlésszám növelése vagy a vizsgálat során alkalmazott koncentrációk közötti intervallum szűkítése általában az EC_x konfidenciaintervallumának csökkenéséhez vezet.

A NOEC becslésének megtervezése

20. A NOEC értékének pontosításához öt vizsgálati koncentrációt kell használni legalább nyolc ismétlésben (4 mindkét [A és B] tenyésztőketrecben), és a koncentrációk aránya nem lehet kettőnél nagyobb. Az ismétlések számának elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy megfelelő erejű statisztikai próbát biztosítson a kontrollhoz viszonyított 20 %-os különbség 5 %-os szignifikanciaszint ($\alpha = 0{,}05$) melletti kimutatásához. A fejlődés üteme, a fekunditás és a termékenység esetében általában megfelelő módszer a varianciaanalízis (ANOVA), amelyet Dunnett-féle próbának vagy Williams-féle próbának kell követnie (22–25). A kikelési arány és az ivararány esetében a Cochran–Armitage-féle próba, a Fisher-féle egzakt próba (Bonferroni-korrekcióval) vagy a Mantel–Haentzal-próba lehet alkalmas módszer.

Határérték-vizsgálat

21. Határérték-vizsgálat (egy vizsgálati koncentráció és kontroll(ok)) végezhető akkor, ha az opcionális előzetes dózisbehatároló vizsgálat során a maximum koncentrációig nem tapasztalunk hatást. A határérték-vizsgálat célja annak jelzése, hogy a vizsgált vegyi anyag a vizsgált határérték-koncentrációnál magasabb szinteken fejt-e ki toxikus hatást. Víz esetében 100 mg/l, üledék esetében 1 000 mg/kg (száraz tömeg) használata javasolt. Általában mind a kezelés, mind a kontroll esetében legalább nyolc

▼M6

ismétlés szükséges. Bizonyítani kell, hogy a kontrollhoz viszonyított 20 %-os különbség 5 %-os szignifikanciaszint (α = 0,05) mellett statisztikai próbával megfelelő valószínűséggel kimutatható. A metrikus válaszok (pl. fejlődési ütem) esetében a t-próba alkalmas statisztikai módszer, amennyiben az adatok az alkalmazási feltételeknek (normalitás, szóráshomogenitás) megfelelnek. Ha a feltételek nem teljesülnek, akkor a nem egyenlő szórásnégyzeteket feltételező t-próba vagy egy nemparaméteres próba, például a Wilcoxon–Mann–Whitney-próba alkalmazható. A kikelési arány esetében a Fisher-féle egzakt próba a megfelelő.

ELJÁRÁS

Expozíciós körülmények

A víz-üledék rendszer elkészítése (szennyezett víz)

22. a. Formulázott üledéket (lásd a 13. és 14. pontot, valamint a 3. függeléket) helyezünk minden vizsgálati edénybe, illetve kristályosító csészébe, hogy legalább 1,5 cm-es (a kristályosító csésze esetében ez valamivel alacsonyabb lehet), de maximum 3 cm-es réteget kapjunk. A rendszerhez annyi vizet (lásd a 15. pontot) adunk, hogy az üledékréteg mélységének és a víz mélységének aránya nem haladja meg az 1:4 értéket. A vizsgálati edény előkészítése után az üledék-víz rendszert az első fejlődési stádiumban lévő 1. vagy 2. generációs lárvák hozzáadása előtt kb. hét napig enyhén levegőztetni kell (lásd a 14. pontot és a 3. függeléket). A kristályosító csésze üledék-víz rendszerét a vizsgálat során nem levegőztetjük, mivel annak nem kell elősegítenie a lárvák túlélését (a petecsomókat már a peték kikelése előtt összegyűjtjük). Az üledéket a vizsgálathoz használt víz ráöntése közben letakarhatjuk egy műanyag lappal, hogy a víz hozzáadása során az üledék ne essen szét összetevőire és a vízrétegben ne kavarodjon fel a finom anyag. A lemezt ezután rögtön eltávolítjuk. Erre a célra más eszközök is alkalmasak lehetnek.

A víz-üledék rendszer elkészítése (szennyezett üledék)

22. b. A 16b. pont szerint előállított szennyezett üledékek az edényekbe, illetve a kristályosító csészébe kerülnek, és annyi fedővizet adunk hozzá, hogy az üledék-víz térfogatarány 1:4 legyen. Az üledékréteg mélységének 1,5 és 3 cm között kell lennie (a kristályosító csésze esetében valamivel alacsonyabb is lehet). Az üledéket a vizsgálathoz használt víz ráöntése közben letakarhatjuk egy műanyag lappal, hogy a víz hozzáadása során az üledék ne essen szét összetevőire és a vízrétegben ne kavarodjon fel a finom anyag. A lemezt ezután rögtön eltávolítjuk. Erre a célra más eszközök is alkalmasak lehetnek. A vízzel fedett szennyezett üledék előállítását követően hagyni kell, hogy a vizsgált vegyi anyag az üledékből a vízfázisba kerüljön, és abban eloszoljon (4) (5) (7) (18). Ez lehetőleg a vizsgálat során alkalmazottal megegyező hőmérsékleti és levegőztetési viszonyok mellett történjen. A kiegyensúlyozódási idő üledék- és vegyianyag-specifikus, tartama óráktól napokig terjedhet, de ritka esetekben öt hetet is igénybe vehet. Mivel ez alatt az idő alatt számos vegyi anyag lebomolhat, az egyensúlyi állapot beállásának megvárása helyett 48 órás kiegyensúlyozódási időszak alkalmazása ajánlott. Ha azonban a vegyi anyag üledékben való bomlási felezési ideje közismerten hosszú (lásd a 8. pontot), a kiegyensúlyozódási időt meg lehet hosszabbítani. E kiegyensúlyozódási idő elteltével meg kell mérni a vizsgált vegyi anyag koncentrációját a fedővízben, a pórusvízben és az üledékben, legalább a vegyi anyag legnagyobb és egy alacsonyabb koncentrációja esetében (lásd a 38. pontot). Ezek a vizsgált vegyi anyagra vonatkozó analitikai meghatározások lehetővé teszik a tömegegyensúly kiszámítását és az eredmények mért koncentrációk alapján történő kifejezését.

23. A vizsgálati edényeket le kell fedni (például üveglappal). Az eredeti vízszint fenntartása érdekében a vizsgálat során elpárolgott vizet szükség esetén pótolni lehet. A sófelhalmozódás elkerülése érdekében desztillált vagy ioncserélt vizet kell használni. A tenyésztőketrecekben található kristályosító csészék nincsenek lefedve, és nem szükséges (de lehet) pótolni

▼M6

bennük a vizsgálati időszak alatt bekövetkezett vízveszteséget, mivel a petecsomók mindössze körülbelül egy napig érintkeznek a vízzel, és a csészéket a vizsgálatnak csak egy rövid szakaszában használjuk.

A vizsgálathoz használt organizmusok hozzáadása

24. A petecsomókat négy-öt nappal az első fejlődési stádiumban lévő 1. generációs lárvák hozzáadása előtt ki kell venni a tenyészetből, és kis edényekben előkészített tenyésztőközegbe kell helyezni. A törzstenyészetből vett vagy frissen készített tenyésztőközeg egyaránt használható. Minden esetben kis mennyiségű táplálékot (például finomra őrölt pelyhesített haleledel leszűrt szuszpenziójának néhány cseppjét) kell hozzáadni a tenyésztőközeghez (lásd a 2. függeléket). Csak a frissen lerakott petecsomókat szabad használni. A lárvák rendszerint a peterakást követő egy-két napon belül kezdenek kikelni (a *C. riparius* esetében 20 °C-on 2–3 napon belül, míg a *C. dilutus* esetében 23 °C-on, illetve a *C. yoshimatsui* esetében 25 °C-on 1–4 napon belül), és fejlődésük négy lárvastádiumban következik be, amelyek mindegyike 4–8 nap időtartamú. A vizsgálatban első fejlődési stádiumban lévő (a kikelés utáni maximum 48 órás korú) lárvákat kell használni. Az első fejlődési stádiumban lévő lárvákat a fejkapszula szélessége alapján lehet azonosítani (7).

25. Tompa pipettával 20-20 darab első stádiumban lévő 1. generációs lárvát helyezünk el véletlenszerűen az üledék-víz rendszert tartalmazó vizsgálati edényekbe. A víz levegőztetését a lárvák vizsgálati edényekhez történő hozzáadása közben szüneteltetjük, és nem is indítjuk újra az ezt követő 24 órában (lásd a 32. pontot). Az alkalmazott vizsgálati tervtől függően (lásd a 19. és 20. pontot) a koncentrációnként felhasznált lárvák száma legalább 120 (koncentrációnként 6 ismétlés) az EC_x értékének pontosítása esetében és 160 (koncentrációnként 8 ismétlés) a NOEC értékének pontosítása esetében. A szennyezett üledékes forgatókönyvben az expozíció a lárvák hozzáadásával kezdődik.

A fedővíz szennyezése

26. Az üledéket fedő vízoszlopot az 1. generációs első stádiumú lárvák hozzáadását követő huszonnégy óra múlva beszennyezzük a vizsgált vegyi anyaggal, majd ismét enyhe levegőztetést biztosítunk (a vizsgálati terv esetleges módosításával kapcsolatban lásd a 7. pontot). A vizsgált vegyi anyag törzsoldatából pipettával kis mennyiségeket juttatunk a vízfelszín alá. Ezt követően a fedővizet megkeverjük, ügyelve arra, hogy az üledék ne kavarodjon fel. A szennyezett vizes vizsgálati tervben az expozíció a víz szennyezésével kezdődik (azaz egy nappal a lárvák hozzáadása után).

A kikelt, kifejlett példányok összegyűjtése

27. A kikelt 1. generációs szúnyogokat a vizsgálati edényekből naponta legalább egyszer, de inkább kétszer gyűjtjük össze (lásd a 36. pontot) aspirátorral, szippantóval vagy hasonló eszközzel (lásd az 5. függeléket). Különös gondot kell fordítani arra, hogy a felnőtt egyedek ne sérüljenek meg. Az egy kezeléshez tartozó négy vizsgálati edényből összegyűjtött szúnyogok abba a tenyésztőketrecbe kerülnek, amelyhez korábban hozzárendeltük őket. Az első (hím) egyed kikelésének napján a kristályosító csészéket beszennyezzük a vizsgált vegyi anyag kis mennyiségű törzsoldatával, amelyet pipettával a vízfelszín alá juttatunk (szennyezett vizes vizsgálati terv). Ezt követően a fedővizet megkeverjük, ügyelve arra, hogy az üledék ne kavarodjon fel. A vizsgált vegyi anyag koncentrációja a kristályosító csészében névlegesen megegyezik az adott tenyésztőketrechez rendelt kezelési edényekben lévő koncentrációval. A szennyezett

▼M6

üledékes vizsgálati terv esetében a kristályosító csészéket körülbelül 11 nappal az expozíció kezdete (azaz az 1. generációs lárvák hozzáadása) után készítjük el, hogy körülbelül 48 óra kiegyensúlyozódási idő telhessen el az első petecsomók lerakása előtt.

28. A petecsomókat csipesszel vagy tompa pipettával gyűjtjük be a tenyésztőketrecben lévő kristályosító csészéből. A petecsomókat egy olyan edénybe helyezzük, amely abból a kristályosító csészéből származó tenyésztőközeget tartalmaz, amelyikből az adott petecsomót gyűjtöttük (pl. egy lyuk a 12-lyukú mikrotiterlemezen legalább 2,5 ml közeggel). A petecsomókat tartalmazó edényt lefedjük, hogy megakadályozzuk a jelentős mértékű párolgást. A petecsomókat a lerakásuk után legalább hat napig megfigyelés alatt tartjuk annak megállapítására, hogy termékenynek vagy terméketlennek minősülnek-e.

A 2. generációhoz legalább három, de lehetőleg hat termékeny petecsomót választunk ki az egyes tenyésztőketrecekből, és bizonyos mennyiségű táplálékot biztosítva hagyjuk őket kikelni. Ezeknek a petecsomóknak a peterakás csúcsán lerakott petecsomók közül kell származniuk, amely a kontrollok esetében rendszerint körülbelül a vizsgálat 19. napjára esik. Ideális esetben ugyanazon a napon kezdjük az összes kezelés 2. generációjának vizsgálatát, de a lárvák fejlődésére gyakorolt – a vegyi anyaggal összefüggő – hatások miatt ez nem mindig lehetséges. Ilyen esetben a magasabb koncentrációkkal való vizsgálat később kezdhető, mint az alacsonyabb koncentrációjú kezelések és a (oldószeres) kontroll.

29. a. A szennyezett vizes vizsgálati terv esetében a 2. generáció üledék-víz rendszere úgy készül, hogy a fedővizet az első stádiumú lárvák vizsgálati edényekhez történő hozzáadása előtt kb. 1 órával szennyezzük be a vizsgált vegyi anyaggal. Pipettával kis mennyiségeket juttatunk a vizsgált vegyi anyag oldatából a vízfelszín alá. Ezt követően a fedővizet megkeverjük, ügyelve arra, hogy az üledék ne kavarodjon fel. A szennyezést követően enyhe levegőztetést biztosítunk.

29. b. A szennyezett üledékes vizsgálati terv esetében a 2. generáció üledék-víz rendszerét befogadó expozíciós edényeket az 1. generációval megegyező módon készítjük el.

30. Tompa pipettával 20–20 darab első stádiumban lévő (a kikelés utáni maximum 48 órás korú) 2. generációs lárvát helyezünk el véletlenszerűen a szennyezett üledék-víz rendszert tartalmazó vizsgálati edényekbe. A víz levegőztetését a lárvák vizsgálati edényekhez történő hozzáadása közben szüneteltetjük, és nem is indítjuk újra az ezt követő 24 órában. Az alkalmazott vizsgálati tervtől függően (lásd a 19. és 20. pontot) a koncentrációnként felhasznált lárvák száma legalább 120 (koncentrációnként 6 ismétlés) az EC_x értékének pontosítása esetében és 160 (koncentrációnként 8 ismétlés) a NOEC értékének pontosítása esetében.

Táplálék

31. A vizsgálati edényekben a lárvákat lehetőleg naponta vagy legalább hetente háromszor meg kell etetni. Napi 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg a *C. yoshimatsui* esetében) haleledel (vizes szuszpenzió vagy finomra őrölt eledel, pl. Tetra-Min vagy Tetra-Phyll; a részleteket lásd a 2. függelékben) lárvánként megfelelő mennyiségű táplálék a fiatal lárvák számára fejlődésük első 10 napjában. Valamivel több táplálékra lehet szükség az idősebb lárvák esetében: lárvánként napi 0,5–1,0 mg mennyiségnek elegendőnek kell lennie a vizsgálat hátralévő részében. Gombaképződés vagy a lárvák pusztulása esetén a táplálékadagot valamennyi kísérleti és kontrolledényben csökkenteni kell. Ha a gombák szaporodása nem állítható meg, akkor a vizsgálatot meg kell ismételni.

A lenyeléssel történő expozíció toxikológiai jelentősége általában nagyobb a szerves szénnel nagy affinitást mutató vegyi anyagok és az üledékhez kovalensen kötődő vegyi anyagok esetében. Ezért az ilyen tulajdonságokkal rendelkező vegyi anyagok vizsgálatakor a lárvák túléléséhez és

▼M6

természetes növekedéséhez szükséges táplálékmennyiség – a szabályozási követelménytől függően – a stabilizációs időszak előtt is hozzáadható a formulázott üledékhez. A vízminőség romlásának megelőzése érdekében haleledel helyett növényi anyagot kell használni, például 0,5 % (száraz tömeg) finomra őrölt nagy csalán (*Urtica dioica*), fehér eperfa (*Morus alba*), fehér here (*Trifolium repens*) vagy paraj- (*Spinacia oleracea*) levelet vagy más növényi anyagot (*Cerophyl*-t vagy alfa-cellulózt). A teljes organikus forrásból származó táplálékadag szennyezés előtti hozzáadása az üledékhez – a vízminőséget és a biológiai teljesítőképességet tekintetbe véve – nem triviális eljárás (21) és nem is szabványosított módszer, de a legújabb vizsgálatok azt mutatják, hogy működik (19) (26). A tenyésztőketrecben elhelyezett felnőtt szúnyogoknak alapesetben nincs szükségük táplálékra, de a fertilitás és a termékenység növekszik, ha a kikelt felnőtt egyedeknek telített szacharóz oldatba áztatott vattát biztosítunk táplálékforrásként (34).

Inkubációs körülmények

32. A vizsgálati edényekben 24 órával mindkét generáció első stádiumú lárváinak hozzáadása után biztosítjuk a fedővíz enyhe levegőztetését, és a levegőztetést a vizsgálat végéig folytatjuk (ügyelni kell arra, hogy az oldott oxigén koncentrációja ne essen az ASV 60 %-a alá). A levegőztetést üveg Pasteur-pipettával oldjuk meg, amelynek kimenetét 2–3 cm-rel az üledékréteg felett rögzítjük, és amely néhány buborékot bocsát ki másodpercenként. Illékony vegyi anyagok vizsgálatakor meg kell fontolni az üledék-víz rendszer levegőztetésének elhagyását, ugyanakkor azonban teljesítsük az ASV minimum 60 %-ára vonatkozó érvényességi kritériumot (10. pont). További útmutatás a (16) szakirodalomban olvasható.

33. A *C. riparius* vizsgálatát 20 °C (± 2 °C) állandó hőmérsékleten kell végezni. *C. dilutus* használata esetén az ajánlott hőmérséklet 23 °C, *C. yoshimatui* esetén pedig 25 °C (± 2 °C). 16 órás megvilágítási időszakot alkalmazunk, 500–1 000 lux fényerővel. A tenyésztőketrecek esetében egyórás hajnali és alkonyati fázist is be lehet iktatni.

Expozíciós időtartam

34. Szennyezett vizes vizsgálati terv: Az 1. generáció expozíciós időszaka akkor kezdődik, amikor a vizsgálati edényekben lévő fedővizet beszennyezzük a vizsgált vegyi anyaggal (ami egy nappal a lárvák elhelyezése után történik – az expozíciós terv esetleges módosításával kapcsolatban lásd a 7. pontot). A 2. lárvageneráció expozíciója azonnal elkezdődik, mivel ezeket olyan üledék-víz rendszerbe helyezzük, amelyet korábban már beszennyeztünk. A *C. riparius* és a *C. yoshimatsui* esetében az 1. generáció maximális expozíciós időtartama 27 nap, a 2. generációé 28 nap (az 1. generációs lárvák egy napot expozíció nélkül töltenek az edényekben). Az átfedést is figyelembe véve a vizsgálat teljes időtartama kb. 44 nap. A *C. dilutus* esetében az expozíció maximális időtartama az 1. és a 2. generáció esetében 64, illetve 65 nap. A vizsgálat teljes időtartama körülbelül 100 nap.

Szennyezett üledékes vizsgálati terv: az expozíció a lárvák hozzáadásával kezdődik, és az időtartama maximum 28 nap a *C. riparius* és a *C. yoshimatsui* mindkét generációja esetében, illetve legfeljebb 65 nap a *C. dilutus* mindkét generációja esetében.

Megfigyelések

Kikelés

35. Mindkét generáció esetében meghatározzuk a fejlődési időt és a kifejlett, élő hím és nőstény szúnyogok teljes számát. A hímek könnyen azonosíthatók tollas antennájuk és vékony testalkatuk alapján.

▼M6

36. A vizsgálati edényeket mindkét generáció esetében legalább hetente háromszor meg kell figyelni a lárvák kontrollal összehasonlítva mutatott abnormális viselkedésének (pl. üledék elhagyása, szokatlan úszómozgás) szemrevételezéses ellenőrzése céljából. A kikelési időszak alatt – amely kb. 12 nappal a *C. riparius* és *C. yoshimatsui* (illetve 20 nappal a *C. dilutus*) lárvák edénybe helyezése után kezdődik – a kikelt szúnyogokat naponta legalább egyszer, de inkább kétszer (kora reggel és késő délután) megszámoljuk, és megállapítjuk az ivarukat. Azonosítás után az 1. generációba tartozó szúnyogokat óvatosan eltávolítjuk az edényekből, és áthelyezzük egy tenyésztőketrecbe. A 2. generációs szúnyogokat azonosítás után eltávolítjuk és elpusztítjuk. A vizsgálati edényekben lerakott 1. generációs petecsomókat külön-külön kell összegyűjteni, és legalább 2,5 ml eredeti közegükből származó vízzel együtt 12-lyukú mikrotiterlemezre (vagy más alkalmas edénybe) kell áthelyezni, amelyet a jelentős mértékű párolgás megelőzése érdekében fedéllel kell lefedni. Az elhullott lárvák és a látható, ki nem kelt bábok számát is fel kell jegyezni. A tenyésztőketrec, a vizsgálati edény és a szippantó szemléltetése az 5. függelékben található.

Szaporodás

37. A szaporodásra kifejtett hatást az 1. generációs szúnyogok által lerakott petecsomók száma és termékenysége alapján értékeljük. A petecsomókat naponta egyszer gyűjtjük össze az egyes tenyésztőtartályokba helyezett kristályosító csészékből. A petecsomókat legalább 2,5 ml eredeti közegükből származó vízzel együtt kell begyűjteni és áthelyezni egy 12-lyukú mikrotiterlemezre (egy petecsomót minden lyukba) vagy más alkalmas edénybe, amelyet a jelentős mértékű párolgás megelőzése érdekében fedéllel kell lefedni. Az egyes petecsomók esetében az alábbi jellemzőket dokumentáljuk: a lerakás napja, méret (normál, azaz 1,0 ± 0,3 cm vagy kisebb; jellemzően ≤ 0,5 cm), szerkezet (normál, azaz banán alakú, spirális petelánccal vagy abnormális, pl. nem spirális petelánc) és termékenység (termékeny vagy terméketlen). A lerakást követő hat nap során értékeljük a petecsomó termékenységét. A petecsomót termékenynek tekintjük, ha a peték legalább egyharmada kikel. A nőstényenként lerakott petecsomók és a nőstényenkénti termékeny petecsomók számának kiszámításához a tenyésztőketrechez adott összes nőstény számát használjuk. A petecsomóban lévő peték számát szükség esetén roncsolásmentesen is meg lehet becsülni a gyűrűszámlálási módszer segítségével (részletek a 32. és 33. pontban).

Analitikai mérések

A vizsgált vegyi anyag koncentrációja

38. A fedővíz, a pórusvíz és az üledék legnagyobb és egy kisebb koncentrációnál vett mintáit legalább az expozíció kezdetén (szennyezett víz esetében lehetőleg egy órával a szennyezést követően) és végén analizáljuk. Ezt mindkét generáció edényei esetében el kell végezni. A tenyésztőketrecekben lévő kristályosító csészékből csak a fedővizet elemezzük, mivel a petecsomók ezzel kerülnek érintkezésbe (a szennyezett üledékes vizsgálati terv esetében meg lehet fontolni az üledékkoncentráció analitikus módszerrel való megerősítését). Ha szükségesnek ítéljük, a vizsgálat alatt további méréseket lehet végezni az üledékkel, a pórusvízzel vagy a fedővízzel. A vizsgált vegyi anyag koncentrációjának meghatározása tájékoztatást nyújt a vizsgált vegyi anyag viselkedéséről/megoszlásáról a vízüledék rendszerben. Az üledékből és a pórusvízből a vizsgálat elején és a vizsgálat során vett mintákhoz (lásd a 39. pontot) az analitikai meghatározások elvégzéséhez további vizsgálati edényeket szükségesek. A szennyezett vizes vizsgálati terv esetében az üledékben nem szükséges méréseket végezni, ha a vizsgált anyag víz és üledék közötti megoszlását egy

▼M6

összehasonlítható feltételek mellett (pl. üledék-víz arány, szennyezés módja, az üledék szerves széntartalma) végzett víz-üledék vizsgálat során egyértelműen meghatároztuk, vagy ha a fedővízben mért koncentrációkról kimutattuk, hogy a névleges vagy mért kezdeti koncentrációk 80–120 %-án belül maradnak.

39. Ha a vizsgálat közben is végzünk méréseket (például a 7. és/vagy a 14. napon), és az analízishez olyan nagy minták szükségesek, amelyek nem gyűjthetők be a kísérleti edényekből anélkül, hogy a mintavétel a vizsgálati tervre hatással lenne, az analitikai meghatározásokat ugyanolyan kezelésnek alávetett (a vizsgálathoz használt organizmusok jelenlétét is beleértve), de biológiai megfigyelések céljára nem használt, külön vizsgálati edényekből származó mintákon kell elvégezni.

40. A szemcseközi víz (= pórusvíz) elkülönítésére ajánlott módszer például a 10 000 g gyorsulással történő centrifugálás 4 °C-on, 30 percig. Szűrést is lehet alkalmazni, amennyiben bizonyított, hogy szűrő nem adszorbeálja a vizsgált vegyi anyagot. Ha a minta mérete túl kicsi, akkor előfordulhat, hogy nem analizálható a pórusvízben lévő koncentráció.

Fizikai és kémiai paraméterek

41. Megfelelő módon kell mérni a pH-t, az oldott oxigént a vizsgálati vízben, valamint a víz hőmérsékletét a vizsgálati edényekben és a kristályosító csészékben (lásd a 10. pontot). A vízkeménységet és az ammóniát a vizsgálat elején és végén kell mérni a kontrollokban, valamint a legmagasabb koncentrációt tartalmazó egyik vizsgálati edényben és kristályosító csészében.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

42. Ennek az életciklus-vizsgálatnak a célja a vizsgált vegyi anyag szaporodásra és – két generáción át – a teljesen kikelt és élő hím és nőstény szúnyogok fejlődési ütemére és teljes számára kifejtett hatásának megállapítása. A kikelési arány esetében a hímek és nőstények adatait össze kell vonni. Ha nincs statisztikailag szignifikáns különbség a különböző ivarok fejlődési ütemének érzékenysége között, a hímek és nőstények eredményeit a statisztikai elemzéshez össze lehet vonni.

43. A fedővízben (szennyezett vizes vizsgálat) vagy az üledékben (szennyezett üledékes vizsgálat) lévő koncentrációban kifejezett hatáskoncentrációkat általában az expozíció elején mért koncentrációk alapján számítjuk ki (lásd a 38. pontot). Ezért a szennyezett vizes vizsgálati terv esetében minden kezelésnél átlagoljuk a mindkét generáció edényeinek fedővizében jellemzően az expozíció elején mért koncentrációkat, valamint a kristályosító csészékben mért koncentrációkat. A szennyezett üledékes vizsgálati terv esetében minden kezelésnél átlagoljuk a mindkét generáció edényeiben (és esetleg a kristályosító csészékben) jellemzően az expozíció elején mért koncentrációkat.

44. Egy becsült pont – azaz az EC_x – kiszámításához az edényenkénti és a tenyésztőketrecenkénti statisztikákat lehet valódi ismétlésekként használni. Bármely EC_x konfidenciaintervallumának kiszámítása során figyelembe kell venni az edények közötti eltéréseket, vagy ki kell mutatni, hogy az eltérés elhanyagolható mértékű. Ha a modell mérési pontokhoz illesztéséhez a legkisebb négyzetek módszerét használjuk, akkor a szóráshomogenitás javítása érdekében az edényenkénti statisztikákat transzformálni kell. Az EC_x értékeket azonban az eredeti válaszértékekre való visszatranszformálás után kell kiszámítani.

▼M6

45. Ha a statisztikai elemzés célja a NOEC meghatározása hipotézisvizsgálat segítségével, figyelembe kell venni az edények közötti eltéréseket, amit az ANOVA módszerek használata garantál (pl. Williams- és Dunnett-féle próba). A Williams-féle próba megfelelő lehet, ha elméletben monoton dózisválasz várható, a Dunnett-féle próba pedig akkor lehet megfelelő, ha a monotonitási hipotézis nem állja meg a helyét. Alternatívaként ennél robusztusabb próbák (27) is helyénvalók lehetnek olyan esetekben, amikor az ANOVA szokásos alapfeltevései nem teljesülnek (31).

Kikelési arány

46. A kikelési arányok diszkrét adatok, amelyek a Cochran–Armitage-próbával elemezhetők lefelé lépegető eljárást alkalmazva, amennyiben arra számítunk, hogy a dózisválasz függvénye monoton, és az adatok ennek az elvárásnak megfelelnek. Ha ez nem így van, akkor a Fisher-féle egzakt próbát vagy a Mantel–Haentzal-próbát használhatjuk a p-értékek Bonferroni- vagy Holm-féle eljárással történő korrekciójával. Ha az ugyanazon koncentrációhoz tartozó ismétlések közötti eltérések bizonyítottan nagyobbak, mint amit a binomiális eloszlás indokolna (amelyet gyakran „extra-binomiális" varianciának neveznek), akkor a (27) szakirodalmi hivatkozásban javasolthoz hasonló robusztus Cochran–Armitage- vagy Fisher-féle egzakt próbát kell alkalmazni.

Meghatározzuk az edényenként kikelt élő szúnyogok (hímek plusz nőstények) összegét (n_e), és elosztjuk az edénybe helyezett lárvák (n_a) számával:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

ahol:

ER = kikelési arány

n_e = kikelt élő árvaszúnyogok egy edényre jutó száma

n_a = az edényekbe helyezett lárvák egy edényre jutó száma (általában 20)

Amikor n_e nagyobb, mint n_a (azaz, ha véletlenül több lárvát vittünk be a tervezett létszámnál), n_a-t egyenlővé kell tenni n_e-vel.

47. Leginkább nagy mintaméret esetén megfelelő alternatív megközelítés, olyan esetekben, amikor extra-binomiális variancia áll fenn, ha a kikelési arányt folytonos változóként kezeljük, és az ilyen *ER*-adatokkal összhangban álló eljárásokat alkalmazunk. A nagy mintát itt úgy kell értelmezni, hogy az egy ismétlésre (edényre) jutó kikelt és nem kikelt árvaszúnyogok száma egyaránt meghaladja az ötöt.

48. Az ANOVA módszerek alkalmazásához az *ER*-értékeket először négyzetgyök arkusz-szinusz vagy Tukey–Freeman-transzformáció segítségével átalakítjuk, hogy a normálishoz közeli eloszlást kapjunk, és a szórásokat kiegyenlítsük. Abszolút gyakoriságok esetén a Cochran–Armitage-, a Fisher-féle egzakt (Bonferroni) vagy a Mantel–Haentzal-próbát lehet használni. A négyzetgyök arkusz-szinusz transzformáció az *ER* négyzetgyökének az arkusz szinuszát ($\sin^{-4}$) adja.

49. A kelési arányok esetében az EC_x-értékeket regresszióanalízissel számítjuk ki (pl. probit, logit vagy Weibull-modell (28)). Ha a regresszióanalízis alkalmatlannak bizonyul (például kettőnél kevesebb részleges válasz esetén), más nemparaméteres módszert, például mozgóátlag-módszert vagy egyszerű interpolációt lehet használni.

Fejlődési ütem

50. A fejlődési idő átlaga megmutatja a lárvák elhelyezése (a vizsgálat 0. napja) és a szúnyogok kísérleti csoportban való kikelése közötti időtartamot (a valós fejlődési idő kiszámításához a lárvák elhelyezés idején elért

▼M6

korát is figyelembe kell venni). A fejlődési ütem (egysége: 1/nap) a fejlődési idő reciproka, és a lárvafejlődésben egy nap alatt elért előrehaladást fejezi ki. Az ilyen jellegű üledék-toxicitási vizsgálatok értékeléséhez inkább a fejlődési ütemet használjuk, mivel kisebb a szórása, homogénebb és a normálishoz közelebb álló eloszlást mutat, mint a fejlődési idő. Ennélfogva a fejlődési ütem nagyobb statisztikai erejű paraméteres vizsgálati eljárások alkalmazását teszi lehetővé, mint a fejlődési idő. A folytonos változónak tekintett fejlődési ütemhez tartozó EC_x-értékek becslésére regresszióanalízist használunk (például (29) (30)). Az átlagos fejlődési ütem NOEC-értéke ANOVA módszerekkel, például Williams-féle vagy Dunnett-féle próbával határozható meg. Mivel a hímek előbb kelnek ki, mint a nőstények, azaz nagyobb a fejlődési ütemük, az összes szúnyog fejlődési üteme mellett érdemes külön-külön is kiszámítani a két ivar fejlődési ütemét.

51. A statisztikai próbához feltételezzük, hogy az x. ellenőrzési napon megfigyelt számú árvaszúnyog az x. nap és az x – 1. nap (l = az ellenőrzések közötti intervallum hossza, általában 1 nap) közötti időintervallum közepén kelt ki. Az egy edényre jutó átlagos fejlődési ütemet ($\bar{x}$) a következő képlettel számítjuk ki:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

ahol:

$\bar{x}$: az egy edényre jutó átlagos fejlődési ütem

i: az ellenőrzési intervallum indexe

m: az ellenőrzési intervallumok maximális száma

f_i: az i ellenőrzési intervallumban kikelt árvaszúnyogok száma

n_e: a kikelt árvaszúnyogok összesített száma a kísérlet végén (Σf_i)

x_i: az i ellenőrzési intervallumban kikelt árvaszúnyogok fejlődési üteme

$$x_i = 1/\text{nap}_i - \frac{l_i}{2}$$

ahol:

nap_i: az ellenőrzési nap (a lárvák elhelyezése óta eltelt napok száma)

l_i: az i ellenőrzési intervallum hossza (napokban kifejezve, általában 1 nap)

Ivarok aránya

52. Az ivarok aránya diszkrét adat, ezért a Fisher-féle egzakt próba vagy egyéb megfelelő módszerek segítségével értékeljük. Az ivarok természetes aránya a *C. riparius* esetében egy, azaz a hímek és nőstények egyenlő számban vannak jelen. A két generáció esetében az ivararányra vonatkozó adatokat ugyanolyan módon kell kezelni. Mivel a szúnyogok edényenkénti maximális száma (azaz 20) túl alacsony az érdemi statisztikai elemzéshez, az egy kezeléshez tartozó összes edényben lévő kifejlett, élő

▼M6

szúnyogok számát ivaronként összeadjuk. Ezeket a nem transzformált adatokat a (oldószeres) kontroll vagy az összevont kontrolladatokkal összehasonlítva vizsgáljuk egy 2 × 2 kontingenciatáblázatban.

Szaporodás

53. A szaporodást – a fekunditással megegyezően – az egy nőstényre jutó petecsomók számával számítjuk. Még pontosabban az adott tenyésztőkétrecben lerakott petecsomók számát elosztjuk a ketrechez adott élő és sértetlen nőstények számával. A fekunditás NOEC-értéke ANOVA módszerekkel, például Williams-féle vagy Dunnett-féle próbával határozható meg.

54. A petecsomók termékenységét az egy nőstényre jutó termékeny petecsomók számának meghatározására használjuk. Az adott tenyésztőkétrecben lerakott termékeny petecsomók számát elosztjuk az adott ketrecbe bevitt élő és sértetlen nőstények számával. A termékenység NOEC-értéke ANOVA módszerekkel, például Williams-féle vagy Dunnett-féle próbával határozható meg.

Vizsgálati jegyzőkönyv

55. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— fizikai jelleg, valamint fizikai-kémiai tulajdonságok (vízoldékonyság, gőznyomás, log K_{ow}, talajra (vagy ha rendelkezésre áll, üledékre) vonatkozó megoszlási hányados, stabilitás vízben és üledékben, stb.);

— kémiai azonosító adatok (közönséges név, kémiai név, szerkezeti képlet, CAS-szám stb.), beleértve a kémiai tisztaságot és a vizsgált vegyi anyag mennyiségi meghatározásához használt analitikai módszert.

A vizsgálathoz felhasznált faj:

— vizsgálati organizmusok: faj, tudományos név, az organizmusok beszerzési forrása és a tenyésztési körülmények;

— a petecsomók és lárvák kezelésére vonatkozó információk;

— az 1. generációs kikelt felnőtt egyedek szippantó segítségével történő kezelésére, stb. vonatkozó információk (lásd az 5. függeléket);

— a vizsgálati organizmusok életkora az 1. és a 2. generáció vizsgálati edényben történő elhelyezés idején.

Vizsgálati feltételek:

— az alkalmazott üledék, azaz természetes vagy formulázott (mesterséges) üledék;

— természetes üledék: az üledék mintavételi helye és leírása, beleértve, ha lehetséges, a szennyeződéssel kapcsolatos információkat; az üledék jellemzői: pH, szerves széntartalom, C/N arány, szemcseméret-eloszlás (adott esetben);

— formulázott üledék: elkészítés, összetevők és jellemzők (szerves széntartalom, pH, nedvesség stb. a vizsgálat kezdetén mérve);

— a vizsgálathoz használt víz elkészítése (mesterséges víz használata esetén) és jellemzői (oxigénkoncentráció, pH, keménység stb. a vizsgálat kezdetén mérve);

▼**M6**

— az üledék és a fedővíz mélysége a vizsgálati edényekben és a kristályosító csészékben;

— a fedővíz és a pórusvíz mennyisége; a nedves üledék tömege pórusvízzel és anélkül a vizsgálati edényekben és a kristályosító csészékben;

— vizsgálati edények (anyag és méret);

— kristályosító csészék (anyag és méret);

— tenyésztőketrecek (anyag és méret);

— a vizsgálati edényekbe és a kristályosító csészékbe kerülő törzsoldatok és vizsgálati koncentrációk elkészítésének módszere;

— a vizsgált vegyi anyag bevitele a vizsgálati edényekbe és a kristályosító csészékbe: vizsgálati koncentrációk, ismétlések száma és oldószerek, ha szükségesek;

— a vizsgálati edények inkubációs körülményei: hőmérséklet, megvilágítási időszak és fényerő, levegőztetés (buborékszám másodpercenként);

— a tenyésztőketrecek és a kristályosító csészék inkubációs körülményei: hőmérséklet, megvilágítási időszak és fényerő;

— a mikrotiterlemezre (vagy más edénybe) helyezett petecsomók inkubációs körülményei: hőmérséklet, megvilágítási időszak és fényerő;

— a táplálásra vonatkozó információk, beleértve a táplálék típusát, elkészítését, mennyiségét és a táplálás rendjét.

Eredmények:

— névleges vizsgálati koncentrációk, mért vizsgálati koncentrációk és a vizsgálati edényekben és a kristályosító csészékben lévő vizsgált vegyi anyag koncentrációjának meghatározására használt analízisek eredményei;

— vízminőség a vizsgálati edényekben és a kristályosító csészékben, azaz pH-érték, hőmérséklet, oldott oxigén, keménység és ammóniatartalom;

— az elpárolgott vizsgálati víz pótlása a vizsgálati edényekben, ha történik ilyen;

— a kikelt hím és nőstény szúnyogok száma edényenként és naponta az 1. és a 2. generációban;

— a kifejlett és élő szúnyogok ivararánya kezelésenként az 1. és a 2. generációban;

— a ki nem kelt lárvák száma edényenként az 1. és a 2. generációban;

— kikelési százalék/arány ismétlésenként és vizsgálati koncentrációnként (hím és nőstény szúnyogok összevonva) az 1. és a 2. generációban;

— a kifejlett és élő szúnyogok átlagos fejlődési üteme ismétlésenként és kezelési arányonként (hím és nőstény szúnyogok külön-külön, illetve összevonva) az 1. és a 2. generációban;

— a kristályosító csészékben lerakott peteszalagok száma tenyésztőketrecenként és naponta;

▼**M6**

— a petecsomók jellemzői (méret, forma és termékenység);

— fekunditás – a petecsomók száma osztva a tenyésztőketrecben elhelyezett nőstények számával;

— termékenység – a termékeny petecsomók száma osztva a tenyésztőketrecben elhelyezett nőstények számával;

— a toxicitási végpontok – például az EC_x (és a hozzá tartozó konfidenciaintervallum), valamint a NOEC – becsült értékei, valamint a meghatározásukhoz használt statisztikai módszerek;

— az eredmények szöveges elemzése, beleértve az e vizsgálati módszertől való eltéréseknek a vizsgálat kimenetelére gyakorolt hatását.

SZAKIRODALOM

(1) E melléklet C.28. fejezete: Árvaszúnyogok életciklusára ható toxicitás vizsgálata üledék-víz rendszerben, szennyezett víz használatával.

(2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). Entomologica Scandinavica, 30: 311–322.

(3) Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.

(7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.

(10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

(11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, Environ. Toxicol. Chem., 25: 2662-2674.

▼**M6**

(12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, Ecotoxicology, 16: 221-230.

(13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, Jp. J. Sanit. Zool., 48: 345-350.

(14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool., 37: 47-57.

(15) E melléklet C.27. fejezete: Árvaszúnyogok életciklusára ható toxicitás vizsgálata üledék-víz rendszerben, szennyezett üledék használatával.

(16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.

(17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, Integr. Environ. Assess. Management.

(18) Environment Canada. (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30, September 1995.

(19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. and J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49: 353-361.

(20) Suedel, B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: 1163-1175.

(21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere, 31: 3291-3303.

(22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20: 482-491.

(24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. J Soils Sediments, 9: 94-102.

(27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics, 48: 577-585.

(28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Res., 18: 213-221.

▼**M6**

(29) Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environ. Toxicol. Chem., 11: 1485-1494.

(30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66: 298-312.

(31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

(32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, Environ. Toxicol. Chem., 16: 1165-1176.

(33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) – baseline experiments for future multi-generation studies, J. Environ. Sci. Health Part A, 42: 1-9.

(34) OECD (2010), Validation *report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

▼**M6**

1. függelék

Fogalommeghatározások

E vizsgálati módszer alkalmazásában a következő fogalommeghatározások alkalmazandók:

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Formulázott üledék, más néven kevert, mesterséges vagy műüledék: a természetes üledék fizikai összetevőinek imitálására használt anyagkeverék.

Fedővíz: a vizsgálati edényben az üledék fölé kerülő víz.

Szemcseközi víz vagy pórusvíz: az üledék és a talaj szemcséi közötti helyet kitöltő víz.

Szennyezett víz: a vizsgált vegyi anyaggal szennyezett víz.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼M6

2. függelék

Ajánlások a *Chironomus riparius* tenyésztéséhez

1. Az árvaszúnyoglárvákat kristályosító csészékben vagy nagyobb edényekben lehet tenyészteni. Az edény aljára vékony rétegben (kb. 5–10 mm) kvarchomokot szórunk. A kovaföld (például Merck, cikkszám: 8117) is megfelelő tenyésztőközegnek bizonyult (ebből vékonyabb, pár milliméteres réteg is elegendő). Ezt követően néhány centiméternyi, célnak megfelelő vizet töltünk az edénybe. A vízszint fenntartása és a kiszáradás megelőzése érdekében az elpárolgott vizet szükség szerint pótolni kell. A vizet ki is lehet cserélni, ha szükséges. Gyenge levegőztetést kell biztosítani. A lárvatenyésztő edényeket megfelelő ketrecben kell tartani, amelyből a kikelő kifejlett példányok nem tudnak kiszökni. A ketrecben elegendő helynek kell lennie a kifejlett példányok rajzásához, különben nem fognak párosodni (minimum kb. 30 × 30 × 30 cm).

2. A ketreceket szobahőmérsékleten vagy 20 ± 2 °C állandó hőmérsékletű helyiségben kell tartani, 16 órán keresztül világosban (fényerő kb. 1 000 lux) és 8 órán keresztül sötétben. A 60 % RH alatti légnedvesség dokumentáltan gátolhatja a szaporodást.

Hígítóvíz

3. Bármilyen alkalmas természetes vagy mesterséges víz használható. Általában kútvizet, klórtalanított csapvizet vagy mesterséges közeget (például Elendt-féle „M4” vagy „M7” közeget, lásd lentebb) használunk. Használat előtt a vizet levegőztetni kell. A tenyésztéshez használt vizet szükség esetén ki lehet cserélni. Ehhez a használt vizet leöntjük vagy kiszívjuk a tenyésztőedényekből ügyelve arra, hogy a lárvák által épített lakócsöveket ne pusztítsuk el.

A lárvák táplálása

4. Az árvaszúnyog-lárvákat pelyhesített haleledellel (Tetra Min®, Tetra Phyll® vagy más márkájú hasonló haleledel) kell etetni, edényenként naponta körülbelül 250 mg mennyiségben. A haleledelt száraz, őrölt por vagy vizes szuszpenzió formájában lehet adagolni: 1,0 g pelyhesített eledelt adunk 20 ml hígítóvízhez, és összekeverjük, hogy homogén keveréket kapjunk. Ezt a készítményt körülbelül 5 ml/edény/nap arányban lehet az állatoknak adni. (Használat előtt felrázandó.) Az idősebb lárvák többet is kaphatnak.

5. A táplálék mennyiségét a vízminőséghez kell igazítani. Ha a tenyésztőközeg zavarossá válik, akkor csökkenteni kell a mennyiséget. Az táplálékadagot szigorú ellenőrzés alatt kell tartani. Ha túl kevés a táplálék, akkor a lárvák a vízrétegbe vándorolnak, ha túl sok, akkor fokozódik a mikrobatevékenység és csökken az oxigénkoncentráció. Mindkét körülmény a fejlődési ütem lassulását okozhatja.

6. Az újonnan létesített tenyésztőedényekhez zöldalga- (például *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) sejtek is adhatók.

A kifejlett példányok táplálása

7. Egyes kísérletek alapján a kifejlett példányok számára telített cukoroldatba mártott vattakorong adható táplálékként.

▼M6

Kikelés

8. 20 ± 2 °C hőmérsékleten a kifejlett példányok körülbelül 13–15 nap elteltével kezdenek megjelenni a lárvatenyésztő edényekben. A hímek tollas csápjuk és vékony testalkatuk alapján könnyen megkülönböztethetők.

Petecsomók

9. Miután a felnőtt egyedek a tenyésztőketrecbe kerültek, a lárvatenyésztő edényekben hetente háromszor ellenőrizni kell, hogy raktak-e le kocsonyás petecsomókat. Ha vannak ilyen petecsomók, óvatosan el kell távolítani azokat. A petecsomókat át kell helyezni a tenyésztővízből vett mintát tartalmazó kis csészébe. A petecsomókat új tenyészetek létrehozására (például 2–4 petecsomó/edény) vagy toxicitási vizsgálatok céljára használjuk fel.

10. Az első fejlődési stádiumban lévő lárváknak 2–3 napon belül kell kikelniük.

Új tenyészetek létesítése

11. A stabil tenyészetekből hetente vagy – a vizsgálati követelményektől függően – ritkábban friss lárvatenyészetek hozhatók létre, miközben a régebbi edényeket a kifejlett árvaszúnyogok megjelenését követően eltávolítjuk. Ezzel a rendszerrel minimális kezelést igénylő módon biztosítható a kifejlett példányok rendszeres utánpótlása.

Az „M4” és „M7” vizsgálati oldat elkészítése

12. Az „M4” közeg leírása Elendt (1990) munkájában található. Az „M7” közeget az „M4” közeggel megegyező módon állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy az 1. táblázatban megjelölt anyagok koncentrációja az „M7” közegben négyszer alacsonyabb, mint az „M4” közegben. A vizsgálati oldatot nem szabad Elendt és Bias (1990) szerint előállítani, mivel a $NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, a $NaNO_3$, KH_2PO_4 és a K_2HPO_4 törzsoldat készítéséhez megadott koncentrációi nem megfelelőek.

Az „M7” közeg elkészítése

13. A törzsoldatok (I) mindegyikét külön készítjük el, majd a törzsoldatokból (I) egy kombinált törzsoldatot (II) állítunk össze (lásd az 1. táblázatot). Az „M7” közeg előállításához a kombinált törzsoldat (II) 50 ml-ét és az egyes makrotápanyagok törzsoldatainak a 2. táblázatban megadott mennyiségeit ioncserélt vízzel 1 literre hígítjuk. Vitamintörzsoldatot is készítünk, amelyhez három vitamint ioncserélt vízhez adunk a 3. táblázatban meghatározottak szerint, majd röviddel a felhasználás előtt a kombinált vitamintörzsoldatból 0,1 ml-t az „M7” közeghez adunk. A vitamintörzsoldatot kis aliquot részekben, fagyasztott állapotban kell tárolni. A közeget levegőztetni és stabilizálni kell.

1. táblázat

Nyomelem-törzsoldatok az M4 és M7 közeghez

Törzsoldatok ([1])	Ioncserélt vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	A kombinált törzsoldat (II) elkészítése: keverjük össze a törzsoldatok (I) alábbi mennyiségét (ml), és hígítsuk fel 1 literre ioncserélt vízzel		Végső koncentráció a vizsgálati oldatokban (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 ([1])	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \times 4H_2O$ ([1])	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl ([1])	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M6**

Törzsoldatok ([1])	Ioncserélt vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	A kombinált törzsoldat (II) elkészítése: keverjük össze a törzsoldatok (I) alábbi mennyiségét (ml), és hígítsuk fel 1 literre ioncserélt vízzel		Végső koncentráció a vizsgálati oldatokban (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl ([1])	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \times 6H_2O$ ([1])	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ([1])	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ ([1])	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \times 2H_2O$ ([1])	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \times 6H_2O$	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
$Na_2EDTA \times 2H_2O$ ([1]) ([2])	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \times 7H_2O$ ([1]) ([2])	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

([1]) Ezeknek az anyagoknak az esetében az M4 és az M7 a fent jelzett módon eltér.
([2]) Ezeket az oldatokat külön kell elkészíteni, majd összeönteni és azonnal autoklávban kezelni.

2. táblázat:

Makrotápanyag-törzsoldatok az M4 és M7 közeghez

	Ioncserélt vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	Makrotápanyag-törzsoldatok M4 és M7 közeg előállításához használt mennyisége (ml/l)	Végső koncentráció a vizsgálathoz használt M4 és M7 oldatban (mg/l)
$CaCl_2 \times 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \times 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \times 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M6**

3. táblázat:

Vitamintörzsoldatok az M4 és M7 közeghez

A három vitaminoldatból egyetlen kombinált vitamintörzsoldatot készítünk.

	Ioncserélt vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	Vitamintörzsoldat M4 és M7 közeg előállításához használt mennyisége (ml/l)	Végső koncentráció a vizsgálathoz használt M4 és M7 oldatban (mg/l)
Tiamin-hidroklorid	750	0,1	0,075
Cianokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

HIVATKOZÁSOK

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: 25-33.

Elendt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, Water Research, 24: 1157-1167.

▼M6

3. függelék

Formulázott üledék elkészítése

AZ ÜLEDÉK ÖSSZETÉTELE

A formulázott üledék összetétele a következő:

Összetevő	Jellemzők	Az üledék száraz tömegére vetített %-os arány
Tőzeg	Tőzegmoha, amelynek pH-ja a lehető legközelebb esik az 5,5–6,0 értékhez, és nem tartalmaz látható növénymaradványokat, finomra őrölve (részecskeméret ≤ 1 mm) és levegőn szárítva	4–5
Kvarchomok	Szemcseméret: a részecskék több mint 50 %-a az 50–200 μm-es tartományba esik	75–76
Kaolinit agyag	Kaolinittartalom ≥ 30 %	20
Szerves szén	Tőzeg és homok hozzáadásával beállítva	2 (± 0,5)
Kalcium-karbonát	$CaCO_3$, porított, vegytiszta	0,05–0,1
Víz	Vezetőképesség ≤ 10 μS/cm	30–50

ELKÉSZÍTÉS

A levegőn szárított tőzeget finom porrá őröljük. A szükséges mennyiségű tőzegporból ioncserélt vízzel nagy teljesítményű homogenizáló készülék segítségével szuszpenziót készítünk. A szuszpenzió pH-ját $CaCO_3$ hozzáadásával 5,5 ± 0,5 értékre állítjuk be. A pH és a mikrobiológiai összetétel stabilizálása céljából a szuszpenziót 20 ± 2 °C hőmérsékleten lassú keveréssel legalább két napig kondicionáljuk. Az ezt követően ismét megmért pH-nak 6,0 ± 0,5 értéket kell mutatnia. Ezek után a tőzegszuszpenziót összekeverjük a többi összetevővel (homok és kaolinagyag), valamint ioncserélt vízzel úgy, hogy az üledék száraz tömegének 30–50 százaléka közötti víztartalommal rendelkező, homogén üledéket kapjunk. A végtermékként kapott keverék pH-ját ismételten megmérjük, és szükség esetén $CaCO_3$ hozzáadásával 6,5–7,5 értékre állítjuk be. Az üledékből vett minta alapján meghatározzuk a száraz tömeget és a szervesszéntartalmat. Ezt követően – az árvaszúnyogokkal végzett toxicitási vizsgálatban való felhasználása előtt – ajánlott a mesterséges üledéket a vizsgálatban használni kívántakkal megegyező körülmények között hét napig kondicionálni.

TÁROLÁS

A mesterséges üledék előállításához használt száraz összetevők száraz, hűvös helyen, szobahőmérsékleten tárolhatók. Az összeállított (nedves) üledék a vizsgálatban való felhasználás előtt nem tárolható. A formulázott üledéket az előállításának záró lépését képező 7 napos kondicionálási időszakot követően azonnal fel kell használni.

HIVATKOZÁSOK

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. and B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, Ecotox. Environ. Safety, 39: 10-20.

▼**M6**

4. függelék

Az elfogadható hígítóvíz kémiai tulajdonságai

ÖSSZETEVŐ	KONCENTRÁCIÓ
Szemcsés anyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 mg/l
Ionizálatlan ammónia	< 1 µg/l
Keménység $CaCO_3$-ban	< 400 mg/l (*)
Maradék klór	< 10 µg/l
Összes szerves foszfort tartalmazó növényvédő szer	< 50 ng/l
Összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer plusz poliklórozott bifenilek	< 50 ng/l
Összes szerves klór	< 25 ng/l

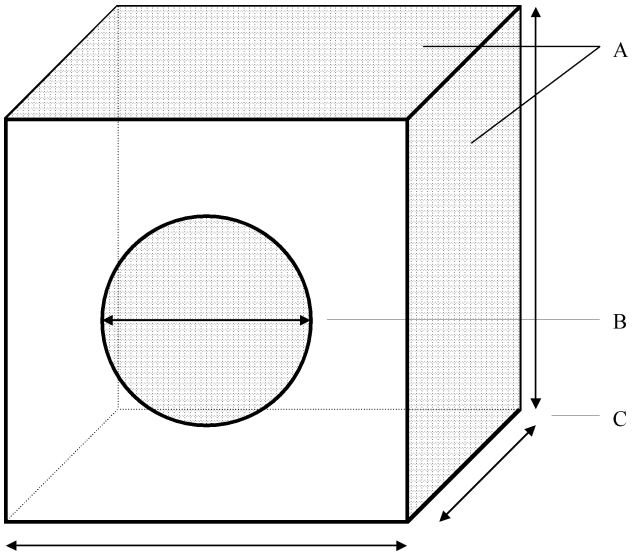
(*) Megjegyzendő, hogy ha a keménységet okozó ionok és a vizsgált vegyi anyag között gyaníthatóan kölcsönhatás alakul ki, akkor lágyabb vizet kell alkalmazni (és ezért az Elendt-féle M4 közeg ilyen esetben nem alkalmazható).

▼**M6**

5. függelék

Iránymutatás a vizsgálat elvégzésére vonatkozóan

Példa a tenyésztőketrecre:



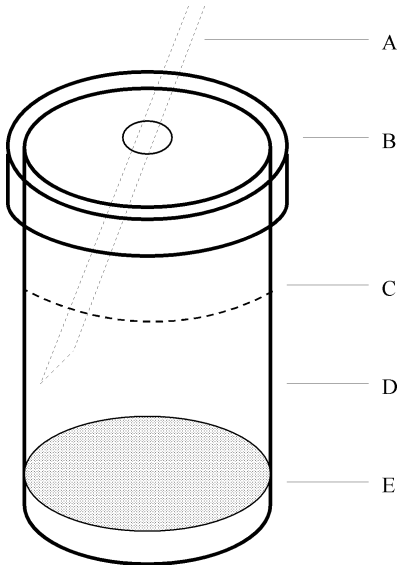
A: géz a ketrec tetején és legalább az egyik oldalán (lyukbőség kb. 1 mm)

B: nyílás a kifejlett felnőtt példányok tenyésztőketrecbe helyezéséhez és a lerakott petecsomók kristályosító csészékből való eltávolításához (az ábrán nem látható)

C: a tenyésztőketrec minimum 30 cm hosszúságú, 30 cm magasságú és 30 cm szélességű

▼**M6**

Példa a vizsgálati edényre:



A: Pasteur-pipetta a fedővíz levegőztetéséhez

B: a kikelt szúnyogok szökését megakadályozó üvegfedél

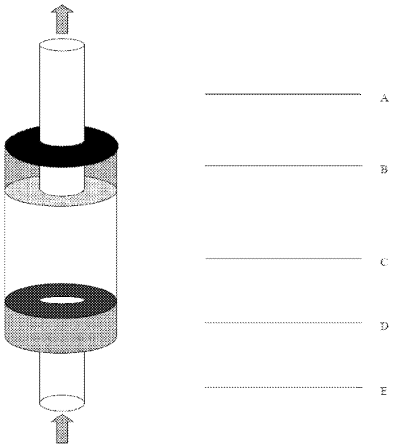
C: vízfelszín

D: vizsgálati edény (minimum 600 ml-es üveg főzőpohár)

E: üledékréteg

▼**M6**

Példa a felnőtt szúnyogok befogására szolgáló szippantóra (a nyilak a levegő áramlási irányát jelzik):



A: üvegcső (belső átmérője kb. 5 mm) egy önfelszívó szivattyúhoz csatlakoztatva

B: vulkanizált gumidugó, üvegcsővel (A) perforálva. Az üvegcső (A) nyílását belül kevés vatta és géz fedi (lyukbőség kb. 1 mm), amely megakadályozza a szúnyogok károsodását, amikor beszívódnak a szippantóba.

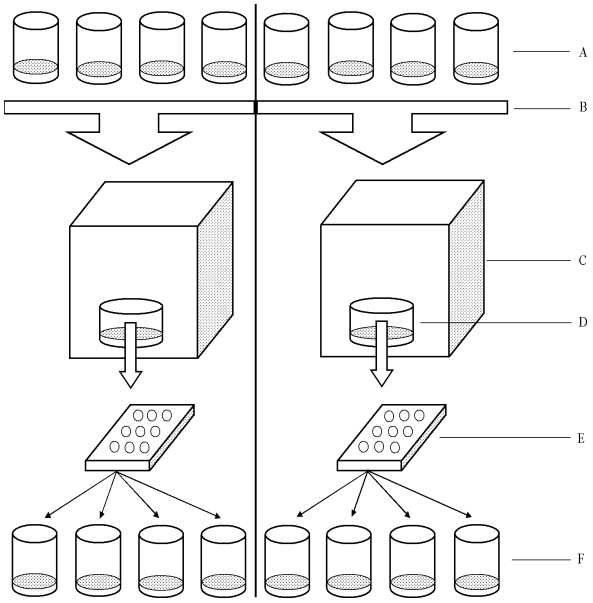
C: átlátszó tartály (műanyag vagy üveg, hossza kb. 15 cm) a befogott szúnyogok számára

D: vulkanizált gumidugó, csővel (E) perforálva. A szúnyogok tenyésztőketrecbe engedéséhez a D dugót ki kell húzni a C tartályból.

E: cső (műanyag vagy üveg, belső átmérője kb. 8 mm) a felnőtt szúnyogok edényből való begyűjtéséhez

▼**M6**

Az életciklus-vizsgálat vázlatos bemutatása:



A: 1. generáció – üledék-víz rendszert tartalmazó vizsgálati edények, nyolc ismétlés, 20 db első stádiumú lárva edényenként

B: négy vizsgálati edény minden egyes tenyésztőketrechez (A és B)

C: tenyésztőketrecek (A és B) a rajzáshoz, párzáshoz és peterakáshoz

D: kristályosító csészék a petecsomók lerakásához

E: mikrotiterlemezek, minden petecsomónak egy lyukkal

F: 2. generáció – üledék-víz rendszert tartalmazó vizsgálati edények, nyolc ismétlés, 20 db első stádiumú lárva edényenként.

▼M6

C.41. HALAK IVARI FEJLŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 234. vizsgálati iránymutatásában (2011) leírt módszerrel. A vizsgálati módszer egy 1998-as döntésen alapul, amelynek értelmében új vizsgálati módszereket kell kifejleszteni a hormonháztartást vélhetően zavaró anyagok szűrésére és vizsgálatára, illetve aktualizálni kell a meglévő módszereket. A halak ivari fejlődésének vizsgálatát (Fish Sexual Development Test, FSDT) ígéretes vizsgálati módszerként azonosították, amely a halak egy olyan érzékeny életszakaszát fedi le, amikor fogékonyak mind az ösztrogén-, mind az androgénszerű vegyi anyagokra. A vizsgálati módszert 2006 és 2010 között laboratóriumok közötti validálási folyamatnak vetteték alá, amelynek során validálták a japán fogasponttyal (*Oryzias latipes*), a zebradánióval (*Danio rerio*) és a tüskés pikóval (*Gasterosteus aculeatus*) végzett vizsgálatot, illetve részben validálták az amerikai csellével (*Pimephales promelas*) végzett vizsgálatot (41) (42) (43). Ez a protokoll a vizsgálathoz a japán fogaspontyot, a tüskés pikót és a zebradániót alkalmazza. A protokoll alapvetően az OECD „A halak korai életszakaszára vonatkozó toxicitási vizsgálat” című 210. vizsgálati iránymutatásának (1) kibővítése, amelynek keretében az expozíció egészen a halak ivari differenciálódásáig folytatódik, azaz a japán fogasponty, a tüskés pikó és zebradánió esetében a kikelés után mintegy 60 napig (days post-hatch, dph) (a jövőben validálásra kerülő egyéb fajok esetében az expozíciós idő rövidebb vagy hosszabb is lehet), illetve a vizsgálatot endokrinszenzitív végpontokkal is kiegészíti. Az FSDT a hormonháztartást vélhetően zavaró vegyi anyagok (pl. ösztrogének, androgének és szteroidogenezis-gátlók) ivari fejlődésre kifejtett hatásait és káros következményeit értékeli a korai életszakaszban. A két alapvető endokrin végpont – a vitellogenin (VTG) koncentrációja és a fenotípusos ivararány – kombinált megfigyelésével a vizsgálat képes kimutatni a vizsgált vegyi anyag hatásmechanizmusát. A populáció szempontjából releváns fenotípusos ivararányváltozás miatt az FSDT a veszélyek és kockázatok értékelésére használható. Ha azonban a vizsgálatot veszély- vagy kockázatértékelés céljából végzik, a tüskés pikót nem szabad használni, mert az eddigi validációs adatok azt mutatják, hogy e faj esetében a fenotípusos ivararány vizsgált anyagok miatti megváltozása nem gyakori.

2. A protokoll szerint a halakat vízen keresztül tesszük ki a vegyi anyagnak abban az ivarilag labilis életszakaszban, amikor várhatóan a legérzékenyebbek a hormonháztartást és ezáltal az ivari fejlődést zavaró vegyi anyagok hatására. Az endokrin rendszerrel összefüggő fejlődési rendellenességek mutatójaként két alapvető végpontot mérünk: a VTG koncentrációját és az ivarmirigyek szövettani vizsgálata segítségével meghatározott ivararányt (az ivarok egymáshoz viszonyított arányát). Az ivarmirigyek kórszövettani vizsgálata (a petesejtek és a spermatogenetikus sejtek értékelése és osztályozása) nem kötelező. Ezenkívül lehetőség szerint a genetikai ivart is meghatározzuk (pl. a japán fogasponty és a tüskés pikó esetében). A genetikai ivari marker jelenléte komoly előny, mivel növeli az ivararányra vonatkozó statisztikák erejét, és lehetővé teszi a fenotípusos ivar megfordulásának kimutatását az egyes egyedek esetében. Az egyéb mérendő apikális végpontok közé tartozik a kikelési és a túlélési arány, a testhossz, valamint a testtömeg. A vizsgálati módszert a fent megadottaktól eltérő fajokra is adaptálni lehet, feltéve, hogy az egyéb fajokat a japán fogasponty, a tüskés pikó és a zebradánió esetében elvégzettel megegyező validálásnak vetjük alá, illetve a kontrollhalak a vizsgálat végén ivarilag differenciáltak, a VTG szintje kellően magas a vegyi anyaggal összefüggő jelentős változások kimutasához, és a vizsgálati rendszer érzékenységét az endokrin rendszerre ható referencia-vegyianyagok ((anti)-ösztrogének, (anti)-androgének, aromatáz inhibitorok stb.) használatával igazoljuk. Emellett az egyéb fajokat felhasználó FSDT-adatokról készült validálási jelentés(eke)t az OECD-nek felül kell vizsgálnia, és a validálás eredményének kielégítőnek kell lennie.

▼M6

Kiindulási megfontolások és korlátok

3. A VTG általában a nőstény ikrarakó gerincesek májában termelődik a keringő endogén ösztrogénekre adott válaszként (2). A VTG az ikra sárgájában található fehérjék prekurzora, és a májban történő megtermelődése után a vérárammal jut el a petefészekbe, ahol a fejlődő ikrák felveszik és módosítják. A VTG-szintézis nagyon korlátozott mértékű – de kimutatható – a fiatal halakban és a kifejlett hím halakban, mivel a szervezetükben nincs elegendő keringő ösztrogén. Ugyanakkor a máj az exogén ösztrogénstimulációra adott válaszul is képes VTG szintetizálására és kiválasztására (3) (4) (5).

4. A VTG mérésével kimutathatók az ösztrogén, antiösztrogén és androgén hatásmechanizmusú vegyi anyagok, valamint a szteroidogenezist zavaró vegyi anyagok, mint például az aromatáz inhibitorok. Az ösztrogenikus vegyi anyagok kimutathatók a hím halakban végbemenő VTG-indukció mérésével, amely módszerre számos hivatkozást találunk a lektorált tudományos szakirodalomban. A VTG-indukcióját aromatizálható androgénekkel szembeni expozíció után is kimutatták (6) (7). A keringő ösztrogén szintjének csökkenése a nőstényeknél – például az endogén androgént természetes ösztrogén 17β-ösztradiollá konvertáló aromatáz gátlása miatt – a VTG-koncentráció csökkenését okozza, amelyet az aromatázgátló tulajdonságokkal rendelkező – vagy tágabban a szteroidogenezist gátló – vegyi anyagok kimutatására használnak (33). Az ösztrogén-/aromatázgátlást követő VTG-válasz biológiai jelentőségét megállapították és széles körben dokumentálták (8) (9). Lehetséges azonban, hogy a VTG-termelést a nőstényeknél az általános toxicitás és a nem az endokrin rendszerre ható toxikus hatásmechanizmusok is befolyásolják.

5. Több rutin mérési módszert is sikeresen kifejlesztettek és szabványosítottak a VTG mennyiségének az egyes halak véréből, májából, egész testéből vagy fej/farok homogenizátumából gyűjtött mintákban történő meghatározására. Ez a helyzet a zebradánió, a tüskés pikó és a japán fogasponty, valamint a – részlegesen validált – amerikai cselle esetében; e fajok tekintetében fajspecifikus enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálatok (ELISA) állnak rendelkezésre, amelyek immunkémiai módszereket használnak a VTG mennyiségi meghatározására (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). A japán fogasponty és a zebradánió esetében jó korreláció áll fenn a vérplazmából, májból és homogenizátumból vett mintákban mért VTG-értékek között, bár a homogenizátumokban általában a plazmánál valamivel alacsonyabb értékek mérhetők (17) (18) (19). A VTG-analízis céljából történő ajánlott mintavételi eljárásokat az 5. függelék tartalmazza.

6. A fenotípusos ivararány (az ivarok egymáshoz viszonyított aránya) változása egy olyan végpont, amely az ivar megfordulására utal. Az ösztrogének, antiösztrogének, androgének, antiandrogének és a szteroidogenezist gátló vegyi anyagok elvileg befolyásolhatják a fejlődő halak ivararányát (20). Kimutatták, hogy az ivar megfordulása a zebradánióban részben visszafordítható (21), ha azt ösztrogénszerű vegyi anyagoknak való expozíció váltja ki, míg az androgénszerű vegyi anyagoknak történő expozíció esetében az ivar megfordulása állandó (30). Nem szerint nőstény, hím, interszexuális (petesejtek és spermatogenetikus sejtek egyazon ivarmirigyben) vagy differenciálatlan egyedeket különböztetünk meg, amelyet az egyes halak ivarmirigyeinek szövettani vizsgálatával határozunk meg. Ezzel kapcsolatban iránymutatás a 7. függelékben és „Az endokrin rendszerrel összefüggő kórszövettani elváltozások diagnózisa halak ivarmirigyében” című OECD-iránymutatásban található (22).

7. A genetikai ivart genetikai markerek segítségével vizsgáljuk, ha vannak ilyenek az adott halfajban. A japán fogaspontyban a nőstény XX vagy a hím XY géneket polimeráz láncreakcióval (PCR) lehet kimutatni, vagy az

▼M6

Y-kapcsolt DM doméngént (DMY) lehet elemezni (DMY negatív vagy pozitív) a (23) és (24) szakirodalmi hivatkozásban leírtak szerint. A tüskés pikó esetében a genetikai ivar meghatározására létezik egy egyenértékű PCR-módszer, amely a 10. függelékben kerül ismertetésre. Amennyiben a genetikai ivart az egyedek szintjén össze lehet kapcsolni a fenotípusos ivarral, a vizsgálat megbízhatósága javul, ezért a genetikai ivart a dokumentált genetikai ivari markerekkel rendelkező fajok esetében meg kell határozni.

8. A két alapvető endokrin végpont – a VTG és az ivararány – együttesen képes bizonyítani a vegyi anyag endokrin rendszerre kifejtett hatásmechanizmusát (mode of action, MOA) (1. táblázat). Az ivararány polulációszinten releváns biomarker (25) (26), és az FSDT eredményeit bizonyos jól meghatározott hatásmechanizmusok esetében a veszélyek és kockázatok elemzésére lehet használni, ha a szabályozó hatóság arra megfelelőnek ítéli. Ezek közé a hatásmechanizmusok közé jelenleg az ösztrogének, az androgének és a szteroidogenezis-gátlók kifejtette hatások tartoznak.

1. táblázat

Az endokrin végpontok reakciói a vegyi anyagok különböző hatásmechanizmusaira:

↑ = nő, ↓ = csökken, — = nem vizsgálták

MOA	VTG ♂	VTG ♀	Ivararány	Hivatkozások
Gyenge ösztrogénagonista	↑	↑	♀↑ vagy differenciálatlan↑	(27) (40)
Erős ösztrogénagonista	↑	↑	♀↑ vagy differenciálatlan↑, ♂ nincs	(28) (40)
Ösztrogénantagonista	—	—	♀↓, differenciálatlan↓	(29)
Androgénagonista	↓ vagy —	↓ vagy —	♂↑, ♀ nincs	(28) (30)
Androgénantagonista	—	—	♀↑ interszexuális↑	(31)
Aromatázinhibitor	↓	↓	♀↓	(33)

9. Az FSDT nem terjed ki a halak reproduktív életszakaszára, ezért az olyan vegyi anyagokat, amelyek esetében fennáll a gyanú, hogy befolyásolják a szaporodást, de alacsonyabb koncentrációban, mint az ivari fejlődést, a szaporodást is magában foglaló vizsgálatban kell megvizsgálni.

10. Az e vizsgálati módszerhez tartozó fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

11. Az *in vivo* FSDT célja, hogy kimutassa az androgén és ösztrogén tulajdonságokkal, valamint az antiandrogén, az antiösztrogén és a szteroidogenezis-gátló tulajdonságokkal rendelkező vegyi anyagokat. Az FSDT (1. és 2.) validálási szakaszai kiterjedtek az ösztrogén, az androgén és a szteroidogenezis-gátló vegyi anyagokra. Az ösztrogén- és androgénantagonisták FSDT keretében bemutatott hatásai az 1. táblázatban láthatók, de ezek a hatásmechanizmusok jelenleg még kevésbé dokumentáltak.

A VIZSGÁLAT ELVE

12. A vizsgálatban halakat teszünk ki – az újonnan megtermékenyített petesejttől az ivari differenciálódás befejeződéséig – a vízben oldott vizsgált vegyi anyag legalább három koncentrációjának. Átfolyásos vizsgálati körülményeket kell alkalmazni, kivéve ha ez a vizsgált vegyi anyag hozzáférhetősége vagy jellege (pl. oldhatóság) miatt nem lehetséges. A vizsgálat az újonnan megtermékenyített (a csírakorong osztódása előtti állapotban lévő) ikrák vizsgálati kamrákba helyezésével kezdődik. A kamrák betelepítésének

▼M6

folyamatát a 27. pont ismerteti fajonként. A validált halfajok, azaz a japán fogasponty, a tüskés pikó és a zebradánió esetében a vizsgálat a kikelés utáni 60. napon ér véget. A vizsgálat befejezésekor a halakat humánusan túl kell altatni. Minden halból biológiai mintát (vérplazma, máj vagy fej/farok homogenizátum) veszünk VTG-elemzés céljára, a többi részt pedig az ivarmirigyek szövettani értékelése céljából fixáljuk, hogy meghatározhassuk a fenotípusos ivart; opcionálisan kórszövettani vizsgálatokat (pl. az ivarmirigyek stádium szerinti osztályozása, az interszexualitás súlyossága) is lehet végezni. A megfelelő markerekkel rendelkező fajok esetében biológiai mintát (farok- vagy hátúszó) veszünk a genetikai ivar meghatározására (9. és 10. függelék).

13. A validált fajokra, azaz a japán fogaspontyra, a tüskés pikóra és a zebradánióra vonatkozó vizsgálati feltételekről a 2. függelék nyújt áttekintést.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

14. Rendelkezésre kell állnia a lehetőleg az ehhez a vizsgálathoz kiválasztott fajjal elvégzett akut toxicitási vizsgálatok vagy más rövid távú toxikológiai vizsgálatok [pl. C.14. vizsgálati módszer (34) és az OECD 210. vizsgálati iránymutatása (1)] eredményeinek. Ez egyben azt is jelenti, hogy ismert a vizsgált vegyi anyag vízoldhatósága és gőznyomása, és a vizsgálati kamrákban lévő vizsgált vegyi anyag mennyiségének meghatározásához olyan megbízható analitikai módszer áll rendelkezésre, amelynek ismert a pontossága és a kimutatási határa.

15. A hasznos információk közé tartozik továbbá a szerkezeti képlet, a vegyi anyag tisztasága, vízben való stabilitása vagy fénystabilitása, a pKa, a P_{ow}, valamint a gyors biológiai lebonthatóságra vonatkozó vizsgálatok eredményei (C.4. módszer) (35).

A vizsgálat elfogadhatósági kritériumai

16. A következő feltételeknek kell teljesülniük ahhoz, hogy a vizsgálat elfogadható legyen:

— A kísérlet során az oldott oxigén koncentrációjának mindvégig legalább a levegőtelítettségi érték (ASV) 60 %-ának kell lennie;

— Az expozíciós időszak alatt a víz hőmérsékletében soha nem lehet ± 1,5 °C-nál nagyobb eltérés a kísérleti tartályok között, és a hőmérsékletet a vizsgált faj tekintetében meghatározott hőmérsékleti tartományban kell tartani (2. függelék);

— Rendelkezésre kell állnia egy validált módszernek az expozíciós vegyi anyag analízisére, amelynek kimutatási határa jóval a legalacsonyabb nominális koncentráció alatt van, és bizonyítékokat kell gyűjteni annak igazolására, hogy a vizsgált anyag oldatban lévő koncentrációit kielégítő mértékben sikerült az átlagos mért értékek ± 20 %-os tartományán belül tartani;

— A kontrollcsoportokban és – adott esetben – az oldószeres kontrollokban a megtermékenyített peték összesített túlélési arányszáma nagyobb a 2. függelékben meghatározott határértékeknél vagy egyenlő azokkal;

— A növekedéssel és a vizsgálat befejezésekor mért ivararányokkal kapcsolatos elfogadhatósági kritériumok a kontrollcsoportok adatain alapulnak (összevont oldószeres és vizes kontroll, kivéve, ha azok jelentősen eltérnek egymástól; ez utóbbi esetben csak az oldószeres kontroll):

▼M6

		Japán fogas-ponty	Zebradánió	Tüskés pikó
Növekedés	Hal nedves súlya, szárazra itatva	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Hosszúság (standard hossz)	> 20mm	> 14 mm	> 20 mm
Ivararány (% hím vagy nőstény)		30–70 %	30–70 %	30–70 %

— Ha oldószert használunk, annak nem lehet statisztikailag szignifikáns hatása a túlélési arányra, és nem idézhet elő semmilyen hormonháztartást zavaró hatást vagy egyéb káros hatást a korai életszakaszban, amelyet az oldószeres kontroll kimutat.

Az elfogadhatósági kritériumoktól való eltérés esetén a vizsgálati adatok megbízhatóságára gyakorolt következményeket mérlegelni kell, és bele kell foglalni a jegyzőkönyvbe.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Vizsgálati kamrák

17. Bármely üvegből, rozsdamentes acélból vagy más, kémiailag inert anyagból készült kamra használható. A kamráknak elég nagyoknak kell lenniük ahhoz, hogy érvényesülhessenek a betelepítési arányra vonatkozóan lentebb megadott kritériumok. Javasolt a vizsgálati kamrák véletlenszerű elhelyezése a vizsgálatra kijelölt területen. Az olyan blokkos véletlenszerű elrendezés, amelyben minden blokkban jelen van az összes koncentráció, előnyösebb a teljesen véletlenszerű elrendezésnél. A vizsgálati kamrákat védeni kell a nem kívánt zavaró hatásoktól.

A faj kiválasztása

18. Az ajánlott halfajok a 2. függelékben találhatók. Az új fajok bevonására vonatkozó eljárásokat a 2. pont ismerteti.

Az ikrás halak tartása

19. Az ikrás halak kielégítő körülmények közötti tartására vonatkozó részletek az OECD 210. vizsgálati iránymutatásában találhatók (1). Az ikrás halakat naponta egyszer vagy kétszer kell megfelelő táplálékkal megetetni.

Az embriók és a lárvák kezelése

20. Az embriók és a lárvák expozíciója kezdhető a fő kamrán belül elhelyezett kisebb, két oldalán vagy a végein hálós kialakítású, így a vizsgált vegyi anyag átáramlását lehetővé tevő üveg vagy rozsdamentes acél kamrákban. E kisebb kamrákban az örvénymentes áramlást úgy lehet elérni, hogy a kamrákat egy fel-le mozgatható karra függesztjük fel, ügyelve arra, hogy az organizmusok mindig a vizsgálati oldatban legyenek.

21. Amennyiben az ikrák tartására kis tartályokat, rácsokat vagy hálókat használunk a fő vizsgálati kamrán belül, akkor a lárvák kikelése után ezeket az akadályozó eszközöket el kell távolítani, kivéve a hálókat, amelyeket a halak szökésének megakadályozása érdekében bent kell tartani. Ha a lárvák áthelyezésére van szükség, nem szabad hagyni, hogy a levegővel érintkezzenek és nem használható háló a halak ikratartályokból való eltávolítására. Az áthelyezés időzítése az egyes fajoktól függően változik, és nincs is mindig szükség rá.

▼M6

Víz

22. Bármely víz alkalmas vizsgálati víznek, amelyben a vizsgált faj kontrollcsoportja legalább olyan jó túlélést mutat, mint a 3. függelékben leírt vízben. A vízminőséget a vizsgálat során mindvégig azonos szinten kell tartani. Annak biztosítására, hogy a hígítóvíz ne gyakoroljon nem kívánt hatást a vizsgálati eredményekre (pl. mert reakcióba lép a vizsgált vegyi anyaggal), illetve ne gyakoroljon kedvezőtlen hatást az ivadékállomány teljesítményére, a vízből időnként mintákat kell venni elemzésre. Ha a hígítóvízről ismert, hogy viszonylag állandó minőségű, az összes szerves széntartalmát, a vezetőképességét, a pH-ját és a szuszpendált szilárd anyagok mennyiségét kell mérni, például háromhavonta. Ha a víz minősége megkérdőjelezhető, a nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), a fontosabb anionok és kationok (pl. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), valamint a növényvédő szerek koncentrációját is mérni kell. A kémiai elemzés és a vízgyűjtés részletei a 34. pontban találhatók.

Vizsgálati oldatok

23. Ha a gyakorlatban kivitelezhető, átfolyásos rendszert kell használni. Az átfolyásos vizsgálatok esetében a koncentrációsorozatnak a vizsgálati kamrákba történő bejuttatása céljából olyan rendszert kell használni, amely folyamatosan adagolja és hígítja a vizsgált vegyi anyag törzsoldatát (pl. adagolószivattyú, proporcionális hígító vagy telítőrendszer). A vizsgálat során időnként ellenőrizni kell a törzsoldatok és a hígítóvíz áramlási sebességét, amelynek értéke a vizsgálat során nem változhat 10 %-nál nagyobb mértékben. A 24 óránként legalább öt vizsgálati kamrányi térfogatnak megfelelő áramlási sebességet találták megfelelőnek (1). Ügyelni kell arra, hogy ne használjunk műanyag csövet vagy egyéb olyan anyagokat, amelyek biológiailag aktív vegyi anyagokat tartalmazhatnak vagy adszorbeálhatják a vizsgált vegyi anyagot.

24. A törzsoldatot lehetőleg oldószer használata nélkül, a vizsgált vegyi anyagnak a hígítóvízbe mechanikai eszközök (pl. keverő, ultrahang) segítségével történő bekeverésével vagy hozzákeverésével kell elkészíteni. Ha a vizsgált anyag nehezen oldódik vízben, „A nehezen vizsgálható anyagok és keverékek vízi toxikológiai vizsgálata” című OECD-iránymutatásban leírtakat kell követni (36). Bár az oldószer használatát kerülni kell, a megfelelő töménységű törzsoldat előállításához egyes esetekben mégis oldószer használatára lehet szükség. Alkalmas oldószerekre a (36) szakirodalmi hivatkozásban találhatók példák.

25. A félstatikus vizsgálati körülményeket kerülni kell, kivéve ha alkalmazásukat a vizsgált vegyi anyaggal kapcsolatos kényszerítő okok indokolják (pl. stabilitás, korlátozott elérhetőség, magas költségek vagy veszélyek). A félstatikus vizsgálatok során a vízcsere két különböző módja közül lehet választani: vagy új vizsgálati oldatokat készítünk tiszta kamarákban, és a túlélő ikrákat és lárvákat óvatosan áthelyezzük ezekbe az új kamarákba, vagy pedig a vizsgálati kamrákban hagyjuk a vizsgált organizmusokat, és a vizsgálati víz egy részét (legalább kétharmadát) naponta cseréljük.

ELJÁRÁS

Expozíciós körülmények

Ikragyűjtés és időtartam

26. Hogy az eredmények genetikai tekintetben torzítatlanok legyenek, legalább három tenyészpártól vagy csoporttól gyűjtünk ikrákat, amelyeket összekeverünk, és véletlenszerűen választunk közülük a vizsgálat megkezdéséhez. A tüskés pikó esetében a mesterséges megtermékenyítés leírását lásd a 11.

▼M6

függelékben. A vizsgálatot az ikrák megtermékenyítése után a lehető leghamarabb el kell kezdeni, és az embriókat lehetőleg a csírakorong osztódásának megkezdődése előtt a vizsgálati oldatokba kell tenni, vagy e stádiumot követően a lehető leghamarabb, de legkésőbb 12 órával a megtermékenyítés után. A vizsgálatot addig kell folytatni, amíg be nem fejeződik az ivari differenciálódás a kontrollcsoportban (60 nappal a kikelés után a japán fogasponty, a tüskés pikó és a zebradánió esetében).

Betelepítés

27. A megtermékenyített ikrák száma a vizsgálat elején koncentrációnként legalább 120 legyen, amelyet minimum 4 ismétlés között kell elosztani (az ikrák kontrollcsoporthoz rendeléséhez elfogadott módszer a négyzetgyök alapú elosztás). Az ikrákat véletlenszerűen kell elosztani a kezelések között (a randomizáláshoz statisztikai táblázatokat használva). A betelepítési aránynak (a fogalom meghatározását lásd az 1. függelékben) elég kicsinek kell lennie ahhoz, hogy a vízben oldott oxigén koncentrációját a kamrák közvetlen levegőztetése nélkül az ASV legalább 60 %-án lehessen tartani. Az átfolyásos vizsgálatok esetében javasolt, hogy a betelepítési arány soha ne haladja meg a 0,5 g/liter/24 óra arányt, illetve az 5 g/liter oldat arányt (2). A halakat legkésőbb 28 nappal a megtermékenyítés után újra szét kell osztani az ismétlések között úgy, hogy minden ismétlés lehetőség szerint ugyanannyi halat tartalmazzon. Ha az expozícióval összefüggésben mortalitás lép fel, az ismétlések számát arányosan csökkenteni kell annak érdekében, hogy a halak sűrűségét kezelésről kezelésre lehetőleg azonos szinten lehessen tartani.

Fény és hőmérséklet

28. A megvilágítási időszakokat és a víz hőmérsékletét a vizsgált halfajok sajátosságaihoz kell igazítani (az FSDT kísérleti feltételeit lásd a 2. függelékben).

Táplálás

29. A táplálék, valamint a táplálás rendje kritikus jelentőségű, és fontos, hogy minden egyes életszakaszban a megfelelő táplálékot biztosítsuk, megfelelő időközönként és a normális növekedés támogatásához megfelelő mennyiségben. Az etetésnek *ad libitum* kell történnie, ugyanakkor minimálisra csökkentve a felesleget. A megfelelő növekedési ütem eléréséhez a halakat legalább naponta kétszer kell etetni (hétvégén elfogadható a naponta egyszeri etetés is), az egyes etetések között legalább három órát hagyva. A táplálékfelesleget és az ürüléket szükség szerint el kell távolítani a hulladék felhalmozódásának elkerülése érdekében. A túlélési arány javítása és a növekedés optimalizálása érdekében a táplálékot és az etetési rendet a tapasztalatok alapján folyamatosan finomítani kell. Törekedni kell ezért arra, hogy a javasolt etetési rendet elismert szakemberek is megerősítsék. A táplálást 24 órával a vizsgálat befejezése előtt fel kell függeszteni. A megfelelő táplálékra példák a 2. függelékben találhatók (lásd még az OECD halvizsgálati keretrendszerét is (39).

Vizsgálati koncentrációk

30. A vizsgált vegyi anyagok osztásközeinek a 4. függelékében leírtakkal kell megegyeznie. Legalább három vizsgálati koncentrációt kell használni legalább négy ismétlésben. A kísérleti koncentrációk tartományának kiválasztásakor célszerű figyelembe venni a rendelkezésre álló akut vizsgálatokban az LC_{50}-et az expozíciós időszakhoz viszonyító görbét. Öt vizsgálati koncentráció javasolt abban az esetben, ha az adatokat kockázatértékeléshez tervezzük használni.

31. Nem szükséges vizsgálni a vizsgált vegyi anyagnak az akut felnőtt LC_{50} 10 %-ánál vagy a 10 mg/l értéknél magasabb koncentrációit (amelyik az alacsonyabb). A legnagyobb vizsgált koncentráció a lárva/fiatal életszakasz LC_{50} értékének 10 %-a legyen.

▼M6

Kontrollok

32. A vizsgálati koncentrációk mellett hígítóvizes kontrollt (≥ 4 ismétlés) és ha szükséges, oldószeres kontrollt (≥ 4 ismétlés) is kell futtatni. A vizsgálathoz csak olyan oldószereket szabad használni, amelyekről vizsgálatokkal kimutatták, hogy nincs statisztikailag jelentős hatásuk a vizsgálati végpontokra.

33. Ha oldószert használunk, az oldószer végső koncentrációja nem lehet nagyobb, mint 0,1 ml/l (36), és a koncentrációnak meg kell egyeznie minden vizsgálati kamrában, kivéve a hígítóvizes kontrollt. Törekedni kell azonban az oldószerek használatának kerülésére, vagy a koncentrációjukat minimális szinten kell tartani.

Az analitikai meghatározások és mérések gyakorisága

34. A vizsgált vegyi anyag koncentrációjának kémiai analízisét a vizsgálat megkezdése előtt kell elvégezni az elfogadhatósági kritériumoknak való megfelelés ellenőrzése céljából. A vizsgálat elején és befejezésekor minden ismétlést egyedileg kell analizálni. A vizsgálat során legalább hetente egyszer analizálni kell vizsgálati koncentrációnként egy ismétlést, szisztematikusan váltogatva az ismétléseket (1,2,3,4,1,2 …). Ha a mintákat egy későbbi időpontban történő elemzés céljából eltároljuk, a minták tárolási módját előzőleg validálni kell. A mintákat szűrni (pl. 0,45 μm pórusméretet használva) vagy centrifugálni kell, hogy a valódi oldatban lévő vegyi anyag koncentrációjának meghatározására kerüljön sor.

35. A vizsgálat során az összes vizsgálati kamrában meg kell mérni a vízben oldott oxigént, a pH-t, a keménységet, a vezetőképességet, a sótartalmat (adott esetben) és a hőmérsékletet. Minimális követelményként az oldott oxigént, a sótartalmat (adott esetben) és a hőmérsékletet hetente kell mérni, míg a pH-t, a vezetőképességet és a keménységet a vizsgálat elején és végén kell mérni. A hőmérsékletet legalább egy vizsgálati kamrában folyamatosan figyelemmel kell kísérni.

36. Az eredményeknek a mért koncentrációkon kell alapulniuk. Ha azonban az oldatban lévő vizsgált vegyi anyag koncentrációját sikerült a vizsgálatok során mindvégig a névleges koncentráció ± 20 százalékos sávján belül tartani, akkor az eredményeket a névleges vagy a mért értékekre is lehet alapozni.

Megfigyelések és mérések

Embrionális fejlődési fázis

37. Az expozíciót a megtermékenyítés után és a csírakorong osztódásának megkezdődése előtt a lehető leghamarabb meg kell kezdeni, de legkésőbb 12 órával a megtermékenyítés után, hogy biztosítsuk az expozíciót a korai embrionális fejlődés során.

Az ikrák kikelése és túlélési aránya

38. A kikelés és túlélés folyamatait naponta egyszer meg kell figyelni és a tapasztalt számadatokat fel kell jegyezni. Az elpusztult embriókat, lárvákat és fiatal halakat az észlelésüket követő lehető legrövidebb időn belül el kell távolítani, mivel gyorsan bomlásnak indulhatnak, vagy daraibjaikra eshetnek a többi hal mozgása következtében. Az elhullott egyedek kiemelésekor különös gondot kell fordítani arra, hogy ne üssük meg vagy okozzunk más módon sérülést a szomszédos ikrákban/lárvákban, mivel ezek az organizmusok igen sérülékenyek és érzékenyek. Az elhullás megállapításának kritériumai az adott életszakasztól függően változnak:

— ikrák: különösen a korai szakaszokban az áttetszőség jelentős csökkenése és színbeli elváltozás, amit a fehérjék koagulációja és/vagy kicsapódása okoz, fehér, opálos színt eredményezve,

▼M6

— lárvák és fiatal halak: mozdulatlanság és/vagy a légzőmozgások és/vagy a szívverés hiánya, és/vagy a központi idegrendszer opálos elszíneződése és/vagy a mechanikai ingerekre adott válasz elmaradása.

Rendellenes megjelenés

39. A rendellenes testformát mutató lárvák, illetve halak számát fel kell jegyezni, és a rendellenesség megjelenését és természetét le kell írni. Megjegyzendő, hogy rendellenesen fejlődő embriók és lárvák természetes körülmények között is előfordulnak, és egyes fajok esetében a kontrollcsoportban mennyiségük akár néhány százalékot is elérhet. A rendellenesen fejlődő állatokat csak elpusztulásuk után kell a vizsgálati kamrákból eltávolítani. Összhangban azonban a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010. szeptember 22-i 2010/63/EU európai parlamenti és tanácsi irányelvvel, ha a rendellenességek fájdalmat, szenvedést és félelmet vagy maradandó egészségkárosodást okoznak, és az elhullást is megbízhatóan előre lehet jelezni, az állatokat a 44. pontban foglaltak szerint érzéstelenníteni kell és el kell altatni, illetve az adatelemzés során ezeket az eseteket mortalitásként kell kezelni.

Rendellenes viselkedés

40. A rendellenességeket, így például a hiperventilációt, a koordinálatlan úszást, az atipikus nyugalmat és az atipikus táplálkozási magatartást megjelenésükkor fel kell jegyezni.

Tömeg

41. A vizsgálat végén az összes életben maradt halat el kell altatni (érzéstelenníteni, ha vérmintát kell venni), és meg kell mérni az egyéni nedves tömegüket (szárazra itatva).

Testhossz

42. A vizsgálat végén meg kell mérni az egyéni testhosszt (standard hossz).

43. E megfigyelések alapján a jegyzőkönyvbe feljegyezhetőek az alábbi adatok vagy azok egy része:

— kumulált mortalitás;

— az egészséges halak száma a vizsgálat végén;

— a kikelés kezdő és befejező időpontja;

— a túlélő állatok hossza és tömege;

— a deformálódott lárvák száma;

— a rendellenes viselkedést mutató halak száma.

Mintavétel a halakból

44. A halakból történő mintavételre a vizsgálat végén kerül sor. A mintavétel során kiválasztott halakat el kell altatni pl. MS-222 (100–500 mg/l, 200 mg $NaHCO_3$/l oldattal pufferolva) vagy FA-100 (4-allil-2-metoxi-fenol: eugenol) készítménnyel, és külön-külön le kell mérni a testhosszukat, illetve a nedves tömegüket (szárazra itatva), vagy ha vérmintát kell venni (lásd a 49. pontot), a halakat érzéstelenníteni kell.

Mintavétel a VTG-elemzéshez és az ivar szövettani elemzéssel történő meghatározásához

45. Az ivar és a VTG elemzése céljából minden halból mintát kell venni. Minden halon szövetttani vizsgálatot kell végezni az ivar meghatározása

▼M6

céljából. A VTG méréséhez az ismétlésenként legalább 16 halból vett részminta elfogadott. Ha a részminta eredményei nem bizonyulnak egyértelműnek, további halakban is elemezni kell a VTG-t.

46. A VTG és az ivar meghatározásához végzendő mintavétel a VTG-elemzés módszerétől függ:

VTG-elemzés fej/farok homogenizátumból

47. A halakat elaltatjuk. A halak fejét és farkát a közvetlenül a mellúszók, illetve a hátúszó mögött szikével végzett vágások segítségével elválasztjuk a testtől (lásd az 1. ábrát). A VTG-elemzéshez a halak fej- és farokrészeit összevonjuk, lemérjük, egyedileg megszámozzuk, folyékony nitrogénben lefagyasztjuk, és – 70 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tároljuk. A halak testét a szövettani elemzés céljából megszámozzuk, és megfelelő fixálóban rögzítjük (22). E módszer alkalmazásával a VTG- és a kórszövettani vizsgálatot minden egyes hal esetében elvégezzük, így a VTG szintjének esetleges változásait össze lehet kapcsolni a hal fenotípusos ivarával vagy a hal genetikai ivarával (a japán fogasponty és a tüskés pikó esetében). További információért lásd a homogenizációra vonatkozó iránymutatást (5. függelék) és a VTG mennyiségi meghatározására vonatkozó iránymutatást (6. függelék).

VTG-elemzés májhomogenizátumból

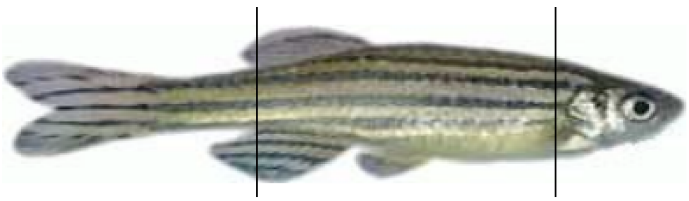
48. A halakat elaltatjuk. A májat kivágjuk és – 70 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tároljuk. A máj kimetszésére és előkezelésére javasolt eljárások az OECD 229. vizsgálati iránymutatásában (37) vagy e melléklet C.37. fejezetében találhatók (38). A májakat ezután az OECD 229. vizsgálati iránymutatásában vagy az e melléklet C.37. fejezetében leírtak szerint egyenként homogenizáljuk. Az összegyűjtött felülúszót a VTG homológ ELISA eljárással történő mérésére használjuk (a zebradánió esetében végzett mennyiségi meghatározás példáját lásd a 6. függelékben, a japán fogasponty esetében pedig lásd az OECD 229. vizsgálati iránymutatását (37)). E megközelítéssel az egyes halak vonatkozásában VTG-adatokat és ivarmirigy-szövettani adatokat is lehet gyűjteni.

VTG-elemzés vérplazmából

49. Az érzéstelenített halakból szívpunkcióval, illetve a farokvénából vagy a farok elvágása útján vért veszünk, majd a vért vérplazma gyűjtéséhez 4 °C-on lecentrifugáljuk. A plazmát felhasználásig – 70 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tároljuk. A halat elaltatjuk és szövettani vizsgálat céljából a teljes testet fixáljuk. A plazmamintákat és a halakat is egyénileg megszámozzuk, hogy a VTG-szinteket össze lehessen kapcsolni a halak ivarával.

1. ábra

A halak feldarabolása a VTG fej/farok homogenizátumból történő mérése és a köztes rész szövettani elemzése céljából



▼M6

Genetikai ivarmeghatározás

50. A megfelelő markerekkel rendelkező fajok esetében a genetikai ivar meghatározása céljából biológiai mintát veszünk az egyes halpéldányokból. A japán fogasponty esetében a farokúszót vagy a hátúszót gyűjtjük be. Részletes leírás a 9. függelékben található, beleértve a szöveti mintavételt és a PCR-módszerrel történő ivarmeghatározást. A szöveti mintavétel és az ivar PCR-módszerrel történő meghatározásának leírását a tüskés pikó esetében a 10. függelék tartalmazza.

A VTG mérése

51. A VTG mérésének analitikusan validált kvantitatív módszeren kell alapulnia. Rendelkezésre kell állnia az adott laboratóriumban alkalmazott módszer vizsgálaton belüli és vizsgálatok közötti variabilitására vonatkozó információknak. A vizsgálaton belüli és vizsgálatok közötti variabilitás (valószínűleg) a halpopuláció különböző fejlődési stádiumaira vezethető vissza. Figyelembe véve a VTG-mérés variabilitását, az egyedül e végpont alapján meghatározott NOEC-értékeket körültekintően kell kezelni. Az e vizsgálati eljárásban alkalmazott halfajok tekintetében különböző módszerek állnak rendelkezésre a halak szervezetében termelődő VTG mérésére. A fehérjekoncentrációk enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálattal (ELISA) történő meghatározása egyszerre specifikus és viszonylag érzékeny mérési technika. Homológ antitesteket (amelyeket ugyanazon faj termel a VTG ellen) és a legfontosabb homológ standardokat kell használni.

Az ivar meghatározása

52. A VTG-mérés céljából alkalmazott mintavételi eljárástól függően az egyes halak egész teste vagy a test fennmaradó középső szakasza előre felcímkézett feldolgozókazettába kerül, majd a szövettani ivarmeghatározáshoz (és adott esetben az ivarmirigyek stádium szerinti osztályozásához) megfelelő fixálószerben rögzítjük. A fixálásra és beágyazásra vonatkozó iránymutatás a 7. függelékben, valamint „Az endokrin rendszerrel összefüggő kórszövettani elváltozások diagnózisa halak ivarmirigyében” című OECD-iránymutatásban található (22). Feldolgozás után a halakat parafintömbökbe ágyazzuk be. Az egyes példányokat hosszirányban kell elhelyezni a paraffintömbben. Minden egyes halból legalább hat hosszirányú metszetet (3–5 μm vastagságú) készítünk a frontális síkban, amelyek ivari szövetet is tartalmaznak mindkét ivarmirigyből. A metszetek közötti távolság kb. 50 μm legyen hímeknél és 250 μm nőstényeknél. Mivel azonban az egyes tömbök gyakran hímeket és nőstényeket is tartalmaznak (ha több, mint egy példányt ágyazunk be az egyes tömbökbe), e tömbök esetében kb. 50 μm távolságot hagyva készítsünk metszeteket, amíg nem kapunk legalább hat metszetet az egyes hímek ivarmirigyeiből. Ezt követően a metszetek közötti távolságot körülbelül 250 μm-re lehet növelni a nőstények estében. A metszeteket haematoxylinnal és eozinnal megfestjük, majd elsősorban az ivarra (hím, nőstény, interszexuális vagy differenciálatlan) figyelve fénymikroszkóp alatt megvizsgáljuk. Interszexuális nemről akkor lehet beszélni, ha több, mint egy petesejt van jelen a here hat elemzett metszetében, vagy spermatogén sejtek (igen/nem) vannak jelen a petefészekben. A kórszövettani vizsgálat, illetve a petefészek és a here stádium szerinti osztályozása nem kötelező, de ha elvégezzük, az eredményeket statisztikailag elemezni és jegyzőkönyvezni kell. Megjegyzendő, hogy bizonyos halfajokból természetes módon hiányzik a teljesen fejlett egy pár ivarmirigy, és előfordul, hogy csak egy ivarmirigy van jelen (pl. japán fogasponty és esetenként a zebradánió). Minden ilyen megfigyelést fel kell jegyezni.

53. A japán fogasponty esetében a genetikai ivar meghatározása a fogasponty hímivart meghatározó – az Y-kromoszómában található – génjének (DMY) jelenlétén vagy hiányán alapul. A fogasponty genotípusos ivarát a DMY gén

▼M6

DNS-ből történő szekvenálásával lehet meghatározni, amelyet például a farokúszó vagy a hátúszó egy darabjából vonunk ki. A DMY jelenléte a fenotípustól függetlenül XY (hím) egyedet jelez, míg a DMY hiánya a fenotípustól függetlenül XX (nőstény) egyedet jelez (23). A szövetek előkészítésére és a PCR-módszerre vonatkozóan a 9. függelékben található iránymutatás. A genetikai ivar tüskés pikó egyedekben történő meghatározását is PCR-módszerrel végezzük, amelyet a 10. függelék ismertet.

54. Az interszexualitás (a fogalom meghatározását lásd az 1. függelékben) előfordulását jegyzőkönyvezni kell.

Másodlagos ivari jellegek

55. A másodlagos ivari jellegek kialakulását az endokrin rendszer szabályozza olyan fajokban, mint például a japán fogasponty, ezért a halak fizikai megjelenésének megfigyelését lehetőség szerint az expozíció végén kell elvégezni. A japán fogasponty nőstényeinél a hátúszó hátsó részén történő papillaképződés androgénérzékeny. E melléklet C.37. fejezetében (38) a hím másodlagos ivari jellegekről és androgenizált nőstényekről készült vonatkozó fényképek találhatók.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

56. Fontos, hogy a legnagyobb statisztikai erővel rendelkező érvényes próba határozza meg a végpontot. A kísérleti egység az ismétlés, de az ismétlésen belüli variabilitást is vizsgálni kell a statisztikai tesztelés során. A 8. függelékben található egy döntési folyamatábra, amely a vizsgálat eredményeként kapott adatok jellegzetességei alapján segít kiválasztani a leginkább megfelelő statisztikai próbát. A statisztikai szignifikanciaszint minden végpont esetében 0,05.

Az ivar és a genetikai ivar aránya

57. Az expozíció ivararányokra gyakorolt szignifikáns hatását (NOEC/LOEC megközelítés) monoton dózisválasz esetén a Jonckheere–Terpstra-próbával (trendpróba) kell elemezni. Ha a válasz nem monoton, akkor páronkénti próbát kell alkalmazni a következők szerint: Ha normalitás és homogén variancia érhető el, használjuk a Dunnett-féle próbát. Heterogén variancia esetén a Tamhane–Dunnett-féle próbát használjuk. Ellenkező esetben használjuk az egzakt Mann–Whitney-féle próbát Bonferroni–Holm-féle korrekcióval. Az ivararányok statisztikáit leíró folyamatábra a 8. függelékben található. Az ivararányokat táblázatokban kell bemutatni a hímek, a nőstények, az interszexuális és a differenciálatlan példányok koncentráció szerinti arányai ± szórás formában. A statisztikailag szignifikáns értékeket ki kell emelni. Példák az FSDT 2. fázisának validálási jelentésében találhatók (42). A genetikai ivart a hímek, a nőstények, az interszexuális és a differenciálatlan példányok fenotípusos ivara megfordulásának százalékában kell jegyzőkönyvezni.

VTG-koncentrációk

58. A VTG-koncentrációkat az expozíció szignifikáns hatásának (NOEC/LOEC megközelítés) kimutatása céljából kell elemezni. A Dunnett-féle próbát előnyben kell részesíteni a (Bonferroni-korrekcióval végzett) t-próbával szemben. Amennyiben Bonferroni-korrekciót alkalmazunk, a Bonferroni–Holm-féle korrekciót kell előnyben részesíteni. Lehetséges a VTG log-transzformációja a normalitás és a szóráshomogenitás elérése céljából. Ha ezt követően a koncentrációválasz monotonitással jellemezhető, a Jonckheere–Terpstra-féle próba előnyösebb, mint a fenti próbák bármelyike. Ha valamilyen t-próbát vagy Dunnett-féle próbát használunk, a továbblépéshez nem kell az ANOVA szignifikanciájának vizsgálatára F-próbát végeznünk. A részleteket lásd a 8. függelékben található folyamatábrán. Az eredményeket táblázatos formában, átlagos koncentráció ± szórás értékben kifejezve kell

▼M6

bemutatni a jegyzőkönyvben, külön-külön a hímek, a nőstények, az interszexuális és a differenciálatlan egyedek esetében. A fenotípusos nőstények és fenotípusos hímek tekintetében kapott statisztikailag szignifikáns értékeket ki kell emelni. Példák az FSDT 2. fázisának validálási jelentésében találhatók (42).

A vizsgált vegyi anyag tényleges koncentrációi

59. A vizsgált vegyi anyag tényleges kamrabeli koncentrációit a 34. pontban leírt gyakorisággal kell elemezni. Az eredményeket táblázatos formában, ismétlésenkénti, valamint koncentrációnkénti átlagos koncentráció ± szórás értékben kifejezve kell bemutatni a jegyzőkönyvben, megjelölve a minták számát, illetve kiemelve a kezelés átlagos koncentrációja ± 20 % tartományból kiugró értékeket. Példák az FSDT 2. fázisának validálási jelentésében találhatók (42).

Az eredmények értelmezése

60. A vizsgálati eredményeket kellő óvatossággal kell értelmezni, ha a vizsgált vegyi anyag vizsgálati oldatokban mért koncentrációi az analitikai módszer kimutatási határértékéhez közeli értékek.

Vizsgálati jegyzőkönyv

61. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag

— Lényeges fizikai-kémiai tulajdonságok; a vizsgált vegyi anyag kémiai azonosító adatai, beleértve a tisztaságot és a mennyiségi meghatározására szolgáló analitikai módszert is.

Vizsgálati körülmények

— Alkalmazott vizsgálati eljárás (pl. átfolyásos, félstatikus/megújításos); vizsgálati terv, beleértve a vizsgálati koncentrációkat, a törzsoldatok elkészítésének módját (mellékletben), a megújítás gyakoriságát (az oldódást segítő szert és koncentrációját is meg kell adni, ha használunk ilyet);

— Névleges vizsgálati koncentrációk, a vizsgálati kamrákban mért értékek átlagai és szórásai, valamint a módszer, amellyel ezeket az adatokat nyertük (az alkalmazott analitikai módszert mellékletben kell bemutatni); bizonyíték arra, hogy a mérések a vizsgált vegyi anyag valódi oldatban lévő koncentrációira vonatkoznak;

— Vízminőség a vizsgálati kamrákban: pH-érték, keménység, hőmérséklet és az oldott oxigén koncentrációja;

— A táplálásra vonatkozó részletes információk (pl. a táplálék(ok) típusa, forrása, az adagolt mennyiség) és a szennyező anyagok vizsgálatának gyakorisága (pl. PCB-k, PAH-ok és szerves klórt tartalmazó növényvédő szerek), ha lényegesek.

Eredmények

— Bizonyíték arra, hogy a kontrollok teljesítették az érvényességi kritériumokat: a kikelési arányra vonatkozó adatokat táblázatos formában kell bemutatni ismétlésenkénti és koncentrációnkénti százalékban. Az elfogadhatósági kritériumoktól kiugróan eltérő értékeket (a kontrollokban) ki kell emelni. A túlélési arányt ismétlésenkénti és koncentrációnkénti százalékos formában kell bemutatni. Az érvényességi kritériumoktól kiugróan eltérő értékeket (a kontrollokban) ki kell emelni.

— A különböző megfigyelt végpontokkal kapcsolatban kapott eredmények egyértelmű megadása: az embriók túlélési aránya és a kikelés eredményessége; külső rendellenességek; testhossz és tömeg; VTG-mérések (ng/g homogenizátum, ng/ml plazma vagy ng/mg máj); ivarmirigy-szövettan,

▼M6

ivararány, a genetikai ivarra vonatkozó adatok; a halak szokatlan reakcióinak előfordulási gyakorisága és a vizsgált vegyi anyag által kiváltott minden látható hatás.

62. Az eredményeket átlag ± szórás vagy standard hiba formában kell bemutatni. A minimálisan jegyzőkönyvezendő statisztikák a NOEC és a LOEC, illetve a konfidenciaintervallumok. A statisztikai folyamatábra (8. függelék) szerint kell eljárni.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test*, Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

(2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, and J.P. Sumpter, 1996, „Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals", Environmental Toxicology and Chemistry 15, pp. 194-202.

(3) Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995, „Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment", Environmental Health Perspectives 103, pp. 173-178.

(4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix, and H. Trip (1999), „An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin", Environmental Toxicology and Chemistry 18, pp. 337-347.

(5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen, and P. Bjerregaard (2001a), „Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 130, pp. 119-131.

(6) Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), „Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters", Fish Physiology and Biochemistry 28, pp. 319-321.

(7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren, and G.I. Petersen (2003), „Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone", Aquatic Toxicology 65, pp. 397-411.

(8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, and C.R. Tyler (2002), „Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances", Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 319-326.

(9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, and Z.J. Wang (2007), „Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (Oryzias latipes) eggs, larvae and breeding adults", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 533-541.

(10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V.Sullivan (1999), „Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 123, pp. 113-125.

(11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, and J.M. Porcher (2002), „Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio)", Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 1699-1708.

(12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002), „Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (Oryzias latipes) vitellogenin", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 132, pp. 161-169.

(13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B.E. Bengtsson (2004), „The juvenile three-spined stickleback (Gasterosteus

▼M6

aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption – II – kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction", Aquatic Toxicology 70, pp. 311-326.

(14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), „Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka", Journal of Health Science 50, pp. 301-308.

(15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), „Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin. Aquatic Toxicology", 78, pp. 202-206.

(16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), „Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (Pimephales promelas)", Ecotoxicology and Environmental Safety 64, pp. 101-105.

(17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), „Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597, pp. 48-51.

(18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), „Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening", Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, pp. 621-633.

(19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), „Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone", Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51, pp. 237-243.

(20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), „Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, Sexual Development 3", pp. 136-151.

(21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005), „An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, Danio rerio", Environmental Toxicology and Chemistry 24, pp. 1088-1098.

(22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.

(23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), „Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, Oryzias latipes", Developmental Dynamics 231, pp. 518-526.

(24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004), „Field survey of sex-reversals in the medaka, Oryzias latipes: genotypic sexing of wild populations", Zoological Science 21, pp. 613-619.

(25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, and R.W. Flick (2007), „Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, pp. 8897-8901.

(26) Palace,V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, and K.A. Kidd (2009), „Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake", Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 66, pp. 1920-1935.

(27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C.R. Tyler (2006), „Development of chronic tests for endocrine active chemicals – Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (Pimephales promelas)", Aquatic Toxicology 77, pp. 279-290.

▼**M6**

(28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), „Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, pp. 57-66.

(29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004), „Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (Danio rerio)", Fish Physiology and Biochemistry 30, pp. 257-266.

(30) Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), „Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations", Aquatic Toxicology 98, pp. 336-343.

(31) Kiparissis,Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), „Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (Oryzias latipes)", Aquatic Toxicology 63, pp. 391-403.

(32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and C.R. Tyler (2004), „Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development", Aquatic Toxicology 70, pp. 11-21.

(33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), „Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (Danio rerio)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 165-170.

(34) E melléklet C.14. fejezete: Halivadékok növekedési vizsgálata.

(35) E melléklet C.4. fejezete: Gyors biológiai lebonthatóság.

(36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

(37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay*, Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

(38) E melléklet C.37. fejezete: 21 napos halvizsgálat. Az ösztrogén- és androgénhatás, valamint az aromatázgátlás rövid távú szűrővizsgálata.

(39) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris

(40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (2007), „Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, Danio rerio" Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A, 70, 9-10 pp 768-779.

(41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paris.

(42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paris.

(43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paris.

(44) Az Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU irányelve (2010. szeptember 22.) a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről. HL L 276., 2010.10.20., 33. o.

▼**M6**

1. függelék

Rövidítések és fogalommeghatározások

Apikális végpontok: populációszinten okoznak hatást

ASV: levegőtelítettségi érték

Biomarker: az egyedek szintjén okoz hatást

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Dph: a kikelés utáni napok száma

DMY: a fogasponty hímeinek fejlődéséhez szükséges Y-specifikus DM doméngén

ELISA: enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)

Hal tömege: a hal nedves tömege (szárazra itatva)

FSDT: halak ivari fejlődésének vizsgálata

HPG-tengely: hypothalamus-hipofízis-gonád tengely

Interszexuális hal: olyan hal, amelyben a here hat elemzett metszetében több mint egy petesejt van jelen, vagy spermatogén sejtek vannak jelen a petefészekben (igen/nem)

Betelepítési arány: a halak nedvesen mért tömege egységnyi mennyiségű vízben

MOA: hatásmechanizmus

RT-PCR: reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

Differenciálatlan hal: olyan hal, amelynek ivarmirigyeiben nincsenek észlelhető csírasejtek.

VTG: vitellogenin

▼M6

2. függelék

Az FSDT kísérleti körülményei (édesvízi fajok)

1. Ajánlott fajok	Japán fogasponty (*Oryzias latipes*)	Zebradánió (*Danio rerio*)	Tüskés pikó (*Gasterosteus aculeatus*)
2. A vizsgálat típusa	Átfolyásos vagy félstatikus	Átfolyásos vagy félstatikus	Átfolyásos vagy félstatikus
3. Vízhőmérséklet	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Megvilágítás minősége	Fluoreszcens izzók (széles spektrum)	Fluoreszcens izzók (széles spektrum)	Fluoreszcens izzók (széles spektrum)
5. Fényerő	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 lux vagy 50–100 ft-c (laboratóriumi környezeti értékek)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 lux vagy 50–100 ft-c (laboratóriumi környezeti értékek)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 lux vagy 50–100 ft-c (laboratóriumi környezeti értékek)
6. Megvilágítási időszak	12–16 óra világos, 8–12 óra sötét	12–16 óra világos, 8–12 óra sötét	16 óra világos, 8 óra sötét
7. Kamra minimális mérete	Az egyes kamráknak legalább 7 l vizet kell tartalmaznia	Az egyes kamráknak legalább 7 l vizet kell tartalmaznia	Az egyes kamráknak legalább 7 l vizet kell tartalmaznia
8. Vizsgálati oldatok térfogatának cseréje	Naponta legalább 5x	Naponta legalább 5x	Naponta legalább 5x
9. Vizsgálati organizmusok életkora az expozíció elején	Újonnan megtermékenyített ikrák (korai hólyagcsíra stádium)	Újonnan megtermékenyített ikrák (korai hólyagcsíra stádium)	Újonnan megtermékenyített ikrák
10. Ikrák száma kezelésenként	Legalább 120	Legalább 120	Legalább 120
11. Kezelések száma	Legalább 3 (plusz megfelelő kontrollok)	Legalább 3 (plusz megfelelő kontrollok)	Legalább 3 (plusz megfelelő kontrollok)
12. Ismétlések száma kezelésenként	Legalább 4 (kivéve, ha a kontrollokat négyzetgyökösen allokálják)	Legalább 4 (kivéve, ha a kontrollokat négyzetgyökösen allokálják)	Legalább 4 (kivéve, ha a kontrollokat négyzetgyökösen allokálják)
13. Etetési rend	Élő *Artemia*, fagyasztott felnőtt sósvízi rák, pelyhesített táplálék stb. Naponta kétszeri etetés javasolt.	Különleges sült táplálék, élő *Artemia*, fagyasztott felnőtt sósvízi rák, pelyhesített táplálék stb. Naponta kétszeri etetés javasolt.	Élő *Artemia*, fagyasztott felnőtt sósvízi rák, pelyhesített táplálék stb. Naponta kétszeri etetés javasolt.
14. Levegőztetés	Nincs, kivéve ha az oldott oxigénkoncentráció a 60 %-os telítettség alá esik	Nincs, kivéve ha az oldott oxigénkoncentráció a 60 %-os telítettség alá esik	Nincs, kivéve ha az oldott oxigénkoncentráció a 70 %-os telítettség alá esik

▼**M6**

15. Hígítóvíz	Tiszta felszíni víz, kútvíz vagy mesterséges víz	Tiszta felszíni víz, kútvíz vagy mesterséges víz	Tiszta felszíni víz, kútvíz vagy mesterséges víz
16. Vizsgált vegyi anyaggal történő expozíció időtartama	60 dph	60 dph	60 dph
17. Biológiai végpontok	kikelés eredményessége, túlélési arány, általános morfológia, VTG ivarmirigy-szövettan, genetikai ivar ivararány	kikelés eredményessége, túlélési arány álatlános morfológia, VTG ivarmirigy-szövettan, ivararány	kikelés eredményessége, túlélési arány álatlános morfológia, VTG ivarmirigy-szövettan, ivararány
18. A vizsgálat elfogadhatósági kritériumai a kontrollok összevont ismétlései esetében	Kikelés eredményessége > 80 %	Kikelés eredményessége > 80 %	Kikelés eredményessége > 80 %
	Kikelés utáni túlélési arány ≥ 70 %	Kikelés utáni túlélési arány ≥ 70 %	Kikelés utáni túlélési arány ≥ 70 %
	Növekedés (hal nedves tömege, szárazra itatva) > 150 mg	Növekedés (hal nedves tömege, szárazra itatva) > 75 mg	Növekedés (hal nedves tömege, szárazra itatva) > 120 mg
	Hossz (standard hossz) > 20 mm	Testhossz (standard hossz) > 14 mm	Testhossz (standard hossz) > 20 mm
	Ivararány (% hím vagy nőstény) 30–70 %	Ivararány (% hím vagy nőstény) 30–70 %	Ivararány (% hím vagy nőstény) 30–70 %

▼**M6**

3. függelék

Az elfogadható hígítóvíz kémiai tulajdonságai

ÖSSZETEVŐ	KONCENTRÁCIÓ
Szemcsés anyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 mg/l
Ionizálatlan ammónia	< 1 μg/l
Maradék klór	< 10 μg/l
Összes szerves foszfort tartalmazó növényvédő szer	< 50 ng/l
Összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer plusz poliklórozott bifenilek	< 50 ng/l
Összes szerves klór	< 25 ng/l

▼**M6**

4. függelék

A C.14. Vizsgálati módszerből / Iránymutatás a vizsgálati koncentrációkhoz

Oszlop (koncentrációértékek száma 100 és 10 vagy 10 és 1 között) (*)						
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

(*) Három (vagy több) egymást követő koncentrációértéket lehet egy oszlopból kiválasztani. Az (x) oszlopban szereplő koncentrációértékek közötti középértékek a (2x + 1) oszlopban találhatók. A felsorolt értékek térfogat- vagy tömegszázalék (mg/liter vagy µg/liter) formájában kifejezett koncentrációértékeket jelenthetnek. Az értékeket adott esetben 10 bármely hatványával meg lehet szorozni vagy el lehet osztani. Az 1. oszlop adatai akkor használhatók, ha jelentős a bizonytalanság a toxicitás szintjét illetően.

▼M6

5. függelék

Útmutató a fiatal a zebradánióból, az amerikai cselléből, a tüskés pikóból és a japán fogaspontyból vett fej/farok minta homogenizációjához

E szakasz célja, hogy bemutassa a VTG-koncentráció mennyiségi meghatározását megelőző eljárásokat. A VTG összehasonlítható mennyiségi meghatározását eredményező egyéb eljárások is alkalmazhatók. A fej/farok homogenizátum helyett lehetőség van a VTG koncentrációjának vérplazmában vagy májban történő meghatározására is.

Eljárás

1. A halakat a vizsgálati leírásnak megfelelően érzéstelenítjük és elaltatjuk.

2. A halak fejét és farkát a vizsgálati leírásnak megfelelően levágjuk. **Fontos:** A boncolóeszközöket, valamint a vágódeszkát az egyes halak kezelése között le kell öblíteni és alaposan meg kell tisztítani (pl. 96 %-os etanollal), hogy megakadályozható legyen a nem indukált hímek nősténytől vagy indukált hímektől eredő „VTG-szennyeződése”.

3. Az egyes halak fejét és farkát együtt a legközelebbi mg-ra megmérjük.

4. A mérés után a testrészek megfelelő (pl. 1,5 ml-es Eppendorf) csövekbe kerülnek és – 80 °C-on homogenizálódásig fagyasztjuk, vagy jégen két műanyag bibével közvetlenül homogenizáljuk azokat. (Más módszerek is használhatók, ha azokat jégen végzik, és homogén tömeget eredményeznek). **Fontos:** *A csöveket megfelelően meg kell számozni, hogy a halból származó fejet és farkat össze lehessen kapcsolni az ivarmirigy-szövettanhoz használt megfelelő törzsdarabbal*.

5. Amikor már elértük a homogén masszát, a szövet tömegének 4–10-szeresét kitevő mennyiségű jéghideg **homogenizáló puffert** (*) adunk hozzá (a hígítást figyelembe kell venni). Dolgozzunk tovább a bibékkel, amíg a keverék homogén nem lesz. **Fontos megjegyzés:** *Minden halhoz új bibét kell használni*.

6. A mintákat a **4 °C**-on 50 000 g-vel 30 percig zajló centrifugálásig jégre tesszük:

7. A felülúszóból pipettával 20–50 µl (jegyezzük fel a mennyiséget) térfogatú adagokat vigyünk át **legalább két** csőbe úgy, hogy a pipetta csúcsát merítsük a felületen lévő zsírréteg alá és óvatosan szívjuk fel a zsír- vagy pelletfrakció nélküli felülúszót.

8. A csöveket felhasználásig – 80 °C hőmérsékleten tároljuk.

(*) *Homogenizáló puffer:*
50 mmol trisz-HCl, pH 7,4; 1 % proteázgátló koktél (Sigma): 12 ml trisz-HCl pH = 7,4 + 120 µl proteázgátló koktél (vagy azzal egyenértékű proteázgátló koktélok).
TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)
Proteázgátló koktél: Sigma (emlősszövetekhez) Termékszám P 8340.

Megjegyzés: A homogenizáló pufferoldatot a készítés napján fel kell használni. Használat közben helyezzük jégre

▼M6

6. függelék

Útmutató a fej/farok homogenizátum vitellogenin-tartalmának mennyiségi meghatározásához zebradánióban (*Danio rerio*) (Holbech és mtsai által módosítva, 2001.). Homológ antitesteket és standardokat használó egyéb eljárások is alkalmazhatók

1. 5 µg/ml anti zebradánió lipovitellin-IgG-vel előzetesen bevont mikrotiter-lemezeket (Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Dánia) felolvasztunk és mosópufferrel (*) 3-szor megmosunk.

2. Tisztított zebradánió vitellogenin standardot ([1]) sorozatban 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 és 20 ng/ml-re hígítunk hígítópufferben (**), és a mintákat hígítópufferben legalább 200-szor hígítjuk (a mátrixhatás megakadályozása céljából), majd felvisszük a lemezekre. Egy vizsgálati kontrollt alkalmazunk két ismétlésben. 150 µl-t viszünk be minden lyukba. A standardokat két példányban, a mintákat három példányban alkalmazzuk. Inkubáljuk egy éjszakán át 4 °C-on rázógépen.

3. A lemezeket mosópufferrel (*) 5-ször lemossuk.

4. Dextránlánchoz kapcsolt HRP-t (pl. AMDEX A/S, Dánia), illetve konjugált antitesteket hígítunk fel mosópufferben; a tényleges hígítás tételenként és életkoronként különbözik. 150 µl-t viszünk be az egyes lyukakba, majd a lemezeket 1 órán át inkubáljuk szobahőmérsékleten, rázógépen.

5. A lemezeket mosópufferrel (*) 5-ször lemossuk, és a lemezek alját gondosan megtisztítjuk etanollal.

6. 150 µl TMB plus (***) készítményt viszünk be az egyes lyukakba. A lemezt alufóliával védjük a fénytől, és kövessük figyelemmel a szín fejlődését a rázógépen.

7. Amikor a standard görbe teljesen kialakult, az enzimaktivitást lyukanként 150 µl 0,2 M H_2SO_4 hozzáadásával leállítjuk.

8. Az abszorbanciát 450 nm-en mérjük (pl. Molecular Devices Thermomax lemezleolvasóval). Az adatok elemzése a hozzá tartozó szoftverrel történik (pl. Softmax).

(*) Mosópuffer:

PBS-törzs (****)	500,0	ml
BSA	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Állítsuk be a pH-t 7,3-ra és töltsük fel 5 l-re Millipore H_2O-val. 4 °C-on tároljuk.

(**) Hígítópuffer:

PBS-törzs (****)	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Állítsuk be a pH-t 7,3-ra és töltsük fel 1 l-re Millipore H_2O-val. 4 °C-on tároljuk.

(***) A TMB plus egy „használatra kész” szubsztrátum, amelyet a KemEnTec (Dánia) készít. Fényre érzékeny. 4 °C-on tároljuk.

([1]) Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), az alábbiak szerint tisztított: 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 törzs

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

Állítsuk be a pH-t 6,8-ra és töltsük fel 2 l-re Millipore H_2O-val. Szobahőmérsékleten tárolandó.

▼M6

7. függelék

Útmutató szövetmetszetek ivarmeghatározás és az ivarmirigyek stádiumbeosztása céljából történő készítéséhez

E szakasz célja, hogy leírja azokat az eljárásokat, amelyek a szövettani metszetek értékelése előtt zajlanak. Hasonló ivarmeghatározást és ivarmirigy-stádiumbeosztást eredményező egyéb eljárások is alkalmazhatók.

Néhány kivételtől eltekintve az eljárások hasonlóak a japán fogasponty (JMD) és zebradánió (ZF) esetében.

Elaltatás, boncolás és szövetrögzítés

Célkitűzések:

1. A halak humánus leölése.

2. A testtömegek és mérési adatok megszerzése.

3. A másodlagos ivari jelleg értékelése.

4. Szövetek boncolása a VTG elemzése céljából.

5. Az ivarmirigyek rögzítése.

Eljárások:

1. A halakat közvetlenül a boncolást megelőzően kell elpusztítani. Ezért – kivéve, ha több boncoló áll rendelkezésre – nem szabad több halat elpusztítani egyszerre.

2. A vizsgálati kamrából kis merítőhálóval eltávolítunk egy halat, és a szállítótartályban átvisszük a boncolási területre.

3. A halat az altatóoldatba helyezzük. A halat akkor távolítjuk el az oldatból, ha a légzés megszűnt, és a hal nem reagál a külső ingerekre.

4. Megmérjük a hal nedves tömegét.

5. A szövetek VTG-elemzés céljából történő előkészítéséhez a halat egy parafalapra lehet helyezni a preparálómikroszkóp látóterében.

   a. A zebradánió fejét közvetlenül a mellúszó mögött vágjuk le, a farkát pedig közvetlenül a hátúszó mögött.

   b. A japán fogasponty hasát egy gondosan elkészített, a vállövtől a ventrális középvonal mentén a végbélnyílástól craniálisan elhelyezkedő pontig terjedő metszéssel felnyitjuk. A májat egy kis csipesz és egy kis olló segítségével óvatosan eltávolítjuk.

6. A VTG-analízishez vett mintákat Eppendorf-csövekbe helyezzük, és folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztjuk.

7. Az ivarmirigyeket tartalmazó test előre felcímkézett műanyag szövetkazettába kerül, amelyet Davidson- vagy Bouin-féle fixálóba helyezünk. A fixáló mennyisége legalább 10-szerese legyen a szövetek közelítőleges térfogatának. A fixáló tartályt öt másodpercig óvatosan keverjük, hogy kimozdítsuk a légbuborékokat a kazettából.

8. a. A szövetek egy éjszakán át a Davidson-féle fixálószerben maradnak, majd a következő napon 10 % semleges pufferelt formalint tartalmazó egyedi tartályokba helyezzük őket át. A kazettákat tartalmazó tartályokat 5 másodpercig óvatosan keverjük, hogy a formalin megfelelően átjárja a kazettákat.

▼M6

b. A szövetek a Bouins-féle fixálóban maradnak 24 órán át, majd 70 %-os etanolba helyezzük át azokat.

A szövetek feldolgozása

Célkitűzések:

1. A szövetek kiszárítása a paraffin megfelelő behatolásának biztosításához.

2. A szövet paraffinos impregnálása a szövetek integritásának fenntartása és a metszetkészítéshez szükséges szilárd felület létrehozása céljából.

Eljárások:

3. A címkével ellátott szövetkazettákat eltávolítjuk a formalin/etanol tárolóból, és a feldolgozó kosárba (kosarakba) helyezzük. A feldolgozó kosarat betöltjük a szövetprocesszorba.

4. Kiválasztjuk a feldolgozási programot.

5. Miután a szövetprocesszor befejezte a feldolgozási ciklust, a kosarat (kosarakat) át lehet vinni a beágyazó állomásra.

Beágyazás

Célkitűzés:

A példányok metszetkészítéshez megfelelő orientálása a megszilárdult paraffinban.

Eljárások:

1. A kazettákat tartalmazó kosarat (kosarakat) eltávolítjuk a processzorból, és elmerítjük a beágyazó állomás termikus konzoljának paraffinnal töltött elülső kamrájában vagy a kazettákat egy külön paraffinmelegítőbe visszük át.

2. Eltávolítjuk a beágyazandó első kazettát a termikus konzol elülső kamrájából vagy a paraffinmelegítőből. Levesszük és kidobjuk a kazetta fedelét, majd a kazetta címkéjét összevetjük az állatokra vonatkozó feljegyzésekkel, hogy az esetleges eltéréseket a beágyazás előtt rendezhessük.

3. Kiválasztunk egy megfelelő méretű beágyazó öntőformát.

4. Az öntőformát a kijuttató konzol nyílása alá tartjuk, és feltöltjük megolvadt paraffinnal.

5. A példányt eltávolítjuk a kazettából, és behelyezzük az öntőformában található olvadt paraffinba. Ezt minden paraffin öntőforma esetében 4–8 példánnyal megismételjük. Az egyes halak helyzetét azzal jelezzük, hogy az első halat a 2–4/8 halhoz képest 180 fokkal elfordítva helyezzük be.

6. További paraffint adunk hozzá, hogy befedje a példányokat.

7. Az öntőformát a kazetta aljával együtt a kriokonzol hűtőlemezére helyezzük.

8. Miután a paraffin megszilárdult, a blokkot (azaz a szöveteket tartalmazó megkeményedett paraffint és kazetta alját) eltávolítjuk a formából.

Metszetkészítés

Célkitűzés:

Szövettani metszetek vágása és tárgylemezre ragasztása a festéshez.

Eljárások:

1. A metszetkészítés kezdeti szakaszát, az úgynevezett „facing”-et a következőképpen hajtjuk végre:

   a. A paraffinblokkot behelyezzük a mikrotóm befogójába.

   b. A befogót a mikrotóm kerekének forgatásával előre mozgatjuk, és vastag szeleteket vágunk le a paraffinblokk felszínéből, amíg a vágókés el nem éri a beágyazott szöveteket.

▼M6

c. A metszetvastagságot 3–5 mikron közé állítjuk be a mikrotómon. A befogót előretoljuk, és több metszetet vágunk le a blokkból, hogy eltávolítsuk a műtermékeket, amelyek a durva vágás során jöttek létre a vágási felületen.

d. A blokkot el lehet távolítani a befogóból, és vágófelülettel lefelé jégre lehet helyezni a szövet beáztatása céljából.

2. A metszetkészítés következő fázisa a végleges metszetek készítése és tárgylemezre rögzítése. Ezeket az eljárásokat a következő módon végezzük:

a. Ha a blokkot jégre helyeztük, akkor eltávolítjuk a jégről, és visszahelyezzük a mikrotóm befogójába.

b. A mikrotóm szeletvastagságát 3–5 mikronra állítva a befogót a mikrotóm kerekének forgatásával előre mozgatjuk. Metszeteket vágunk le a blokkból mindaddig, amíg egy olyan „szalagot” nem állítunk elő, amely legalább egy elfogadható, az ivarmirigyeket is magában foglaló metszetet tartalmaz. (Szükség esetén a szeletelés során a blokkot el lehet távolítani a befogóból, és jégre tenni a szövet beáztatása céljából, majd visszatenni a befogóba.)

c. A metszeteket a vízfürdőben lévő víz felszínén lebegtetjük. Megkísérlünk legalább egy olyan metszetet készíteni, amely nem tartalmaz gyűrődéseket és nincs alatta levegőbuborék.

d. A mikroszkóplemezt a legjobb metszet alá merítjük, és a tárgylemezzel kiemeljük a vízből. Ezt a folyamatot nevezik a metszet tárgylemezre való „ragasztásának”.

e. Egy haltételből három metszetet készítünk. A második és harmadik metszetet az első metszetet követő 50 mikronos intervallumonként készítjük. Ha a halak nem úgy lettek beágyazva, hogy az ivarmirigyeik ugyanazon a metszésszinten legyenek, több metszetet kell készíteni annak érdekében, hogy legalább hat olyan metszetet nyerjünk minden egyes halból, amelyek tartalmazzák az ivarmirigyeket.

f. A tárgylemezre megfelelő filctollal ráírjuk annak a blokknak a számát, amelyből a tárgylemez készült.

g. A tárgylemezt egy festőállványba helyezzük.

h. A blokkot eltávolítjuk a befogóból és vágófelülettel lefelé helyezzük tárolás céljából.

Festés, fedőlemez ráhelyezése és a tárgylemez felcímkézése

Célkitűzések:

— A metszetek kórszövettani vizsgálathoz történő megfestése.

— A felragasztott és festett szövetek tartós lezárása.

— A megfestett metszetek tartós azonosítása olyan módon, amely lehetővé teszi a teljes nyomonkövethetőséget.

Eljárások:

1. Festés

a. A metszeteket festés előtt egy éjszakán át levegőn szárítjuk.

b. A metszeteket hematoxilin-eozinnal megfestjük.

2. A fedőlemez ráhelyezése

a. A fedőlemezeket manuálisan vagy automatikusan lehet ráhelyezni.

b. A tárgylemezt xilolba vagy TissueClear készítménybe mártjuk, és a felesleges xilolt/TissueClear készítményt finoman leütögetjük a tárgylemezről.

▼**M6**

c. Körülbelül 0,1 ml ragasztóközeget viszünk fel a tárgylemez matt végével ellentétes vége közelében, vagy a fedőlemezre.

d. A fedőlemezt lapos szögben megdöntjük, és ráhelyezzük a tárgylemezre.

3. Címkézés

a. A tárgylemez címkéjének a következő információkat kell tartalmaznia.

i. Laboratórium neve

ii. Faj

iii. Példány száma / Tárgylemez száma

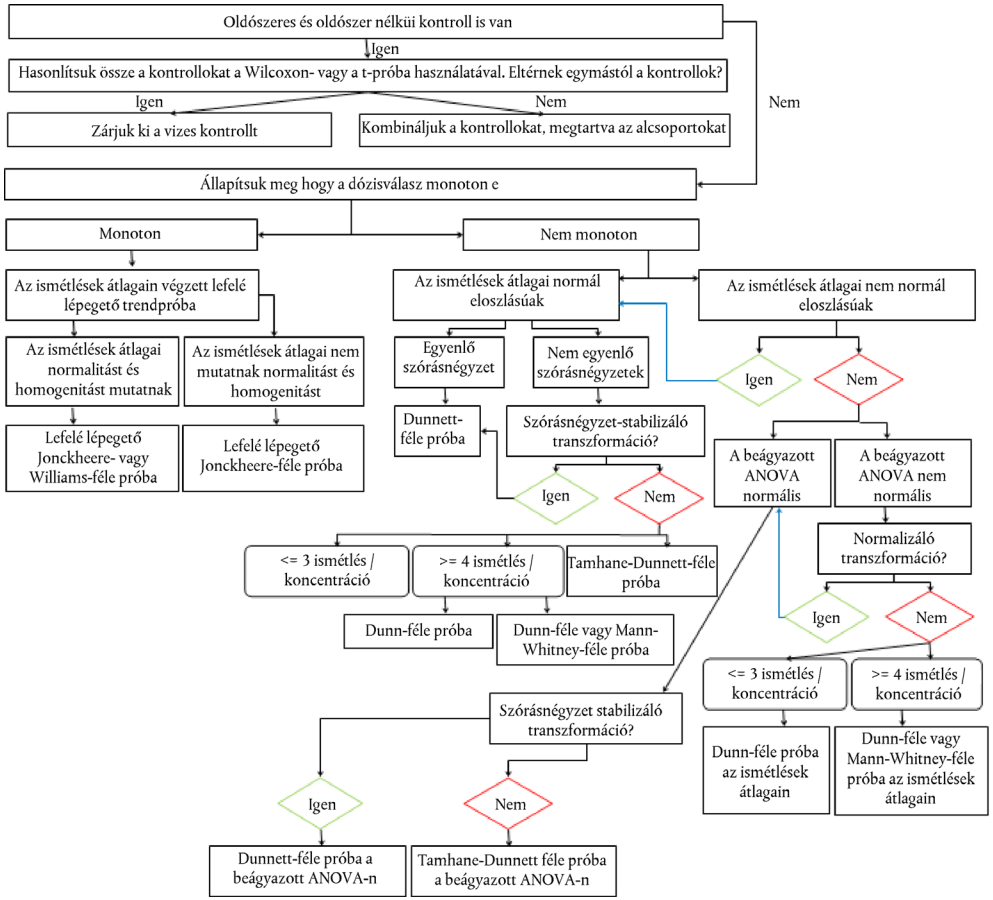
iv. Vegyi anyag / Kezelési csoport

v. Dátum

▼M6

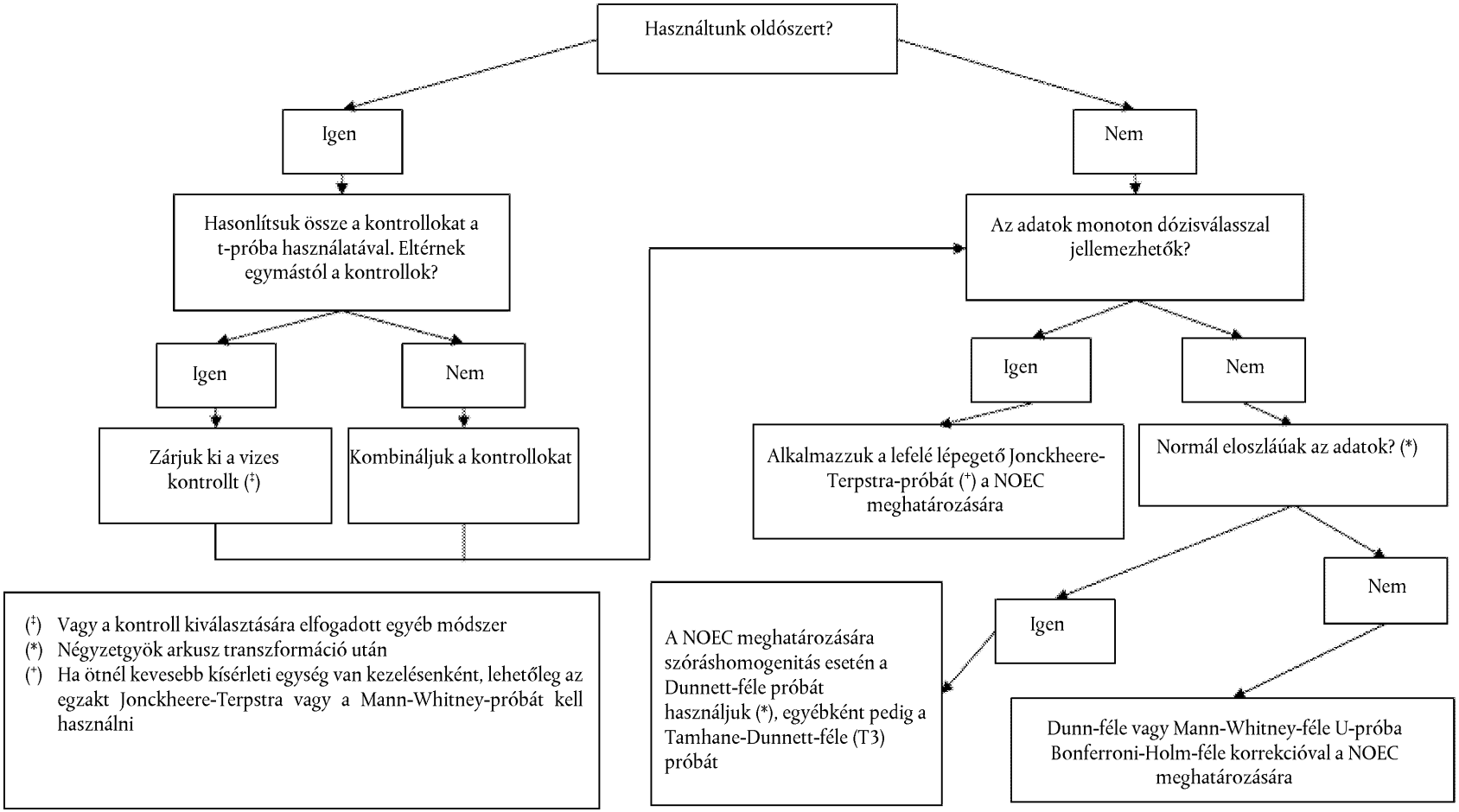
8. függelék

Statisztikai folyamatábra a vitellogenin elemzéséhez



▼M6

Statisztikai folyamatábra az ivararány elemzéséhez



▼M6

9. függelék

Útmutató a genetikai ivar meghatározását és a genetikai ivar PCR-módszerrel történő meghatározását célzó szöveti mintavételhez

Szöveti mintavétel, előkészítés és tárolás a genetikai ivar PCR-módszerrel történő meghatározásához fogaspontyban (Készítette: a Bayer CropScience AG vízi élőlények laboratóriuma)

1. Finom ollóval levágjuk a halak farokúszóját vagy hátúszóját és egy 100 µl extrakciós puffer 1-gyel (a puffer előállításának részleteit lásd alább) megtöltött csőbe helyezzük. Az ollót minden hal után megtisztítjuk desztillált H_2O-val megtöltött pohárban, és papírkendővel szárazra töröljük.

2. Az úszók szöveteit a sejtek lízise céljából microcsöves teflon bibével homogenizáljuk. Minden csőhöz új bibét használunk a szennyeződés elkerülése érdekében. A bibét éjszakára 0,5 mólos NaOH-oldatba helyezzük, majd 5 percig öblítjük desztillált H_2O-val, és felhasználásig etanolban vagy autoklávozás után sterilen tároljuk.

3. Az úszók szöveteit extrakciós puffer 1. nélkül is tárolni lehet szárazjégen, majd – 80 °C-on fagyasztóban a DNS degenerációjának megelőzése érdekében. De az extrakció eredményesebb, ha a DNS-t ugyanakkor vonjuk ki (a kezelést lásd fent; a mintákat a – 80 °C-on történő tárolás után a puffercsövekbe való betöltés előtt jégen fel kell olvasztani).

4. Homogenizálás után a csövek vízfürdőbe kerülnek és 100 °C-on 15 percig forraljuk azokat.

5. Ezután minden csőbe 100 µl extrakciós puffer 2-t (a puffer előállításának részleteit lásd alább) pipettázunk. A mintákat 15 percig szobahőmérsékleten tároljuk és időnként kézzel óvatosan összerázzuk.

6. Ezt követően a csöveket újra vízfürdőbe helyezzük, és 100 °C-on további 15 percen át forraljuk.

7. További elemzésig a csöveket – 20 °C-on lefagyasztjuk.

A puffer készítése

PCR-puffer 1.:

500 mg N-lauroil-szarkozin (pl. Merck KGaA, Darmstadt, GE)

2 ml 5 mólos NaCl

deszt. H_2O ad 100 ml

→ autoklávozás

PCR-puffer 2.:

20 g Chelex (pl. Biorad, München, Németország)

Megduzzasztás 100 ml deszt. H_2O-ban

→ autoklávozás

A genetikai ivar meghatározása (PCR-módszer) fogaspontyban (készítette: a Bayer CropScience AG vízi élőlények laboratóriuma és az Universität Würzburg Biozentrum)

Az elkészített és lefagyasztott csöveket (a fenti szakaszban leírtak szerint) jégen felolvasztjuk. Ezt követően Eppendorf-centrifugában lecentrifugáljuk őket (30 mp max. sebességen, szobahőmérsékleten). A PCR-hez a csapadéktól elválasztott tiszta felülúszó kerül felhasználásra. Feltétlenül el kell kerülni azt, hogy a Chelex nyomait (a csapadékban található) átvigyük a PCR-reakcióba, mert az zavarja a „Taq”-polimeráz aktivitását. A felülúszót közvetlenül felhasználjuk vagy fagyasztva tárolható (– 20 °C-on) és több ciklusban újra felolvasztható anélkül, hogy az a későbbi elemzések során negatív hatással lenne a DNS-re.

▼**M6**

1. *A „reakciókeverék” elkészítése (25 µl mintánként):*

	Térfogat	Végső koncentráció
DNS-templát	0,5–2 µl	
10xPCR-puffer $MgCl_2$-dal	2,5 µl	1x
Nukleotidok (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mmol)	200 µmol
Forward primer (10 µmol) (lásd alább 3-5)	0,5 µl	200 nmol
Reverz primer (10 µmol) (lásd alább 3-5)	0,5 µl	200 nmol
DMSO	1,25 µl	5 %
Víz (PCR tisztaságú)	25 µl-re	
Taq E-polimeráz	0,3 µl	1,5 U
10xPCR-puffer $MgCl_2$-dal: 670 mmol trisz/HCl (pH 8,8 25 °C-on), 160 mmol $(NH_4)_2SO_4$, 25 mmol $MgCI_2$, 0,1 % Tween 20		

Minden PCR-hez (lásd alább 3-5) a „reakciókeverék” új kombinációjaként a speciális primerre, valamint az egyes mintákhoz szükséges DNS-templát megfelelő mennyiségére (lásd fent) van szükség. Az egyes térfogatokat pipettával visszük át az új csövekbe. Ezután a csöveket lezárjuk, összekeverjük (körülbelül 10 másodpercig) és centrifugáljuk (10 mp, szobahőmérsékleten). Ekkor elindíthatók a megfelelő PCR-programok. Ezen kívül az egyes PCR-programokban egy pozitív kontrollt (ismert aktivitású és egyértelmű eredményeket adó DNS-minta) és egy negatív kontrollt (1 µl deszt. H_2O) is használunk.

2. *Az agaróz gél (1 %) elkészítése – A futó PCR-programok alatt:*

— Oldjunk fel 3 g agarózt 300 ml 1 × TAE-pufferben (1 %-os agaróz gél)

— Ezt az oldatot mikrohullámmal fel kell forralni (kb. 2-3 perc)

— Töltsük át a forró oldatot egy jégre fektetett speciális öntődobozba

— Kb. 20 perc múlva az agaróz gél használatra kész

— Az agaróz gélt 1 × TAE-pufferben tároljuk a PCR-programok végéig

3. *Aktin PCR-program:*

Ennek a PCR-reakciónak a célja annak bizonyítása, hogy a mintában lévő DNS nem sérült.

— Speciális primer:

„Mact1(felső/forward)” → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

„Mact2(alsó/reverz)” → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Program:

5 perc 95 °C

Ciklus (35-ször):

Denaturáció → 45 mp 95 °C-on

Kapcsolódás → 45 mp 56 °C-on

Lánchosszabbítás → 1 perc 68 °C-on

15 perc 68 °C

▼M6

4. *X- és Y-gén PCR-program:*

Ebben a PCR-programban a sértetlen DNS-t tartalmazó mintákat használjuk az X- és Y-gének kimutatására. A hím DNS-nek dupla sávot kell mutatnia, a nőstény DNS-nek pedig egyetlen sávot (festés és gélelektroforézis után). Ebbe a programba egy pozitív kontrollt kell bevonni a hímek (XY-minta) és egy pozitív kontrollt a nőstények (XX-minta) részére.

— Speciális primer:

„PG 17.5” (felső/forward) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

„PG 17.6” (alsó/reverz) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Program:

5 perc 95 °C

Ciklus (40-ször):

Denaturáció	→ 45 mp 95 °C-on
Kapcsolódás	→ 45 mp 55 °C-on
Lánchosszabbítás	→ 1 perc 30 mp 68 °C-on

15 perc 68 °C

5. *Y-gén PCR-program az X- és Y-gén PCR-program „kontrolljaként”:*

Ez a PCR-program az „X- és Y-gén PCR-program” eredményeit ellenőrzi. A „hím mintáknak” egy sávot kell mutatniuk, a „nőstény minták” pedig nem mutathatnak semmilyen sávot (festés és gélelektroforézis után).

— Speciális primer:

„DMTYa (felső/forward)” → GGC CGG GTC CCC GGG TG

„DMTYd (alsó/reverz)” → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Program:

5 perc 95 °C

Ciklus (40-szer):

Denaturáció	→ 45 mp 95 °C-on
Kapcsolódás	→ 45 mp 56 °C-on
Lánchosszabbítás	→ 1 perc 68 °C-on

15 perc 68 °C

6. *A PCR-minták festése:*

Festékoldat:

50 % glicerin

100 mmol EDTA

1 % SDS

0,25 % bromofenolkék

0,25 % xilén-cianol

Minden csőbe pipettázzunk 1 µl festékoldatot

7. *Kezdjük meg a gélelektroforézist:*

— Az elkészített 1 %-os agaróz gélt áttöltjük egy 1 × TAE-pufferrel töltött gélelektroforézis-kádba

— Minden festett PCR-mintából 10–15 µl mennyiséget pipettázunk egy agarózgél-zsebbe

— Az 1kb-„létrából” (Invitrogen) is 5–15 µl-t pipettázunk egy külön zsebbe

— Indítsuk el az elektroforézist 200 V-tal

— 30–45 perc múlva állítsuk le

▼**M6**

8. *A sávok meghatározása:*

— Tisztítsuk le az agaróz gélt desztillált H_2O-ban

— Most 15–30 percre tegyük át az agaróz gélt etídium-bromidba

— Ezután az agaróz gélt egy UV-fénydobozban le kell fényképezni

— Végül a mintákat a pozitív kontroll sávval (vagy sávokkal) és a létrával összehasonlítva elemezzük

▼M6

10. függelék

Útmutató a genetikai ivar PCR-módszerrel történő meghatározását célzó szöveti mintavételhez tüskés pikóban

Szöveti mintavétel és DNS-kivonás

A DNS-t különböző kereskedelmi forgalomban kapható reagensek, valamint kézi és automatikus extrakciós berendezések segítségével lehet kivonni. Az alábbiakban a Cefas Weymouth laboratórium által alkalmazott protokoll kerül bemutatásra, adott esetben az alternatív megközelítések hozzáadásával.

1. Finom ollóval kis darab szövetet (10–20 mg) metszünk ki a halak testének dorsolaterális részéből (a fej és a farok VTG-elemzés céljából történt eltávolítása után). A szövetet egy csőbe tesszük, és közvetlenül folyékony nitrogénbe helyezzük (– 80 °C-on történő tárolás céljából), vagy feltöltjük 70 %-os etanollal (szállítás és azt követő 4 °C-on történő tárolás céljából). Az ollót minden egyes hal után 70 %-os etanolban, majd desztillált vízben megtisztítjuk és törlőpapírral megszárítjuk.

2. Az etanolt (ha jelen van) kiszívjuk, és a szövetet egy éjszakán át 400 µl ATL-pufferben (Qiagen) proteináz K-val emésztjük. Az emésztmény egy alikvotját (200 µl) átvisszük egy 96 lyukú S-blokkba (Qiagen), és a DNS-t 96 lyukas formátumban kivonjuk a Qiagen Universal BioRobot és a QIamp Investigator BioRobot készlet használatával. A DNS-t 50 µl DNáz- és RNáz-mentes vízben eluáljuk. Ha kemény szövetet használunk a DNS kivonására (például gerincet vagy mellúszót), szükség lehet a minta lízis pufferben való homogenizálására, amely célra a FastPrep® szövetoldót vagy azzal egyenértékű szövetbontó rendszert lehet használni.

   Alternatív megoldásként

   a) a szövetet egy éjszakán át proteináz K-val emésztjük 400 µl G2 lízis pufferben (Qiagen), és a DNS-t az emésztmény 200 µl mennyiségéből vonjuk ki vagy az EZ-1 DNA easy tissue kit és az EZ-1 biorobot, vagy a DNA easy tissue mini kit segítségével. A DNS-t 50 µl térfogatban eluáljuk.

   b) A szöveteket DNAzol reagens alkalmazásával dolgozzuk fel. Röviden, a szövetmintákat 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőbe töltött 1 ml DNAzol-ban 10 percig lizáljuk, majd a szemcsés anyag eltávolítása céljából 13 000 rpm-en 5 percig centrifugáljuk. A lizált mintát ezután áttöltjük egy új 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőbe, amely 500 µl 100 %-os molekuláris tisztaságú etanolt tartalmaz, majd a DNS kicsapatása céljából 13 000 rpm-en 10 percig centrifugáljuk. Az etanolt eltávolítjuk és a helyébe 400 µl 70 %-os molekuláris tisztaságú etanolt töltünk, 13 000 rpm-en 5 percig centrifugáljuk, és a DNS-üledéket feloldjuk 50 µl molekuláris DNáz- és RNáz-mentes vízben. Ismételten, ha kemény szövetet használnak (mellúszó), szükség lehet a minta lízis pufferben való homogenizálására, amely célra a DNS kivonása előtt FastPrep® szövetoldót vagy azzal egyenértékű szövetbontó rendszert lehet használni.

3. A DNS-t felhasználásig – 20 °C-on tároljuk.

Fontos megjegyzés: az eljárások során kesztyű viselése kötelező.

Polimeráz láncreakció (PCR) analízis

Az amplifikálást 2,5 µl DNS-kivonattal 50 µl reakciótérfogatban végezzük Idh lokusz primerek használatával (a Peichel és mstai által leírtak szerint, 2004. Current Biology 1: 1416-1424):

Forward primer	5 'GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'
Reverz primer	5 'TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

▼M6

A megfelelő PCR-reagenseknek számos szállítója van. Az alábbiakban bemutatott módszer a Cefas Weymouth laboratóriumban jelenleg használt módszer.

1. *A „reakciókeverék" elkészítése (50 µl mintánként):*

Egy mesterkeveréket állítunk elő a következőképpen. Ezt előre is el lehet készíteni és a felhasználásig – 20 °C-on fagyasztva tárolni. Elegendő mesterkeveréket készítünk egy negatív kontrollhoz (csak molekuláris biológiai tisztaságú víz).

	Térfogat (törzs konc.) / minta	Végső koncentráció
5xGoTaq® reakciópuffer	10 µl	1x
$MgCl_2$	5 µl (25 mmol)	2,5 mmol
Nukleotidok (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (mindegyik 25 mmol)	mindegyik 250 µmol
Forward primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µmol
Reverz primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µmol
Molekuláris biológiai tisztaságú víz	30,75 µl	
GoTaq polimeráz	0,25 µl	1,25 U

— Töltsünk 47,5 µl mesterkeveréket egy felcímkézett 0,5 ml-es vékonyfalú PCR-csőbe.

— Adjunk hozzá 2,5 µl tisztított DNS-t a megfelelően felcímkézett csőhöz. Ismételjük meg ugyanezt a folyamatot az összes mintánál és a negatív kontrollnál is.

— Töltsünk a tetejére 2 csepp ásványi olajat. Alternatívaként fűtött fedelű hőciklizálót is használhatunk.

— Zárjuk le a fedeleket.

— A mintákat Peltier PTC-225 hőciklizálóban 94 ± 2 °C-on 5 percig denaturáljuk, majd 39 ciklus következik 94 ± 2 °C-on 1 percig, 55 ± 2 °C-on 1 percig, 72 ± 2 °C-on 1 percig, és egy végső lánchosszabbítás 72 ± 2 °C-on 10 percig.

2. *Az agaróz gél (2 %) elkészítése:*

A PCR-termékeket hagyományosan etídium-bromidot tartalmazó 20 %-os agaróz gélen futtatjuk meg.

Kapilláris alapú elektroforézis rendszerek is használhatók.

— Mérjünk 2 g agarózt 100 ml 1 × TAE-pufferbe.

— Melegítsük mikrohullámban (kb. 2-3 percig) az agaróz feloldása érdekében.

— Adjunk hozzá 2 csepp etídium-bromidot; végső koncentráció 0,5 µg/ml.

— Töltsük a forró oldatot a gélöntő berendezésbe.

— Hagyjuk a gélt megkeményedni.

3. *Gélelektroforézis:*

— Vigyük át az agaróz gélt az elektroforézis berendezésbe és merítsük 1 × TAE-pufferbe.

— Töltsünk minden mintából 20 µl-t külön zsebbe, egy tartalék zsebbe molekulatömeg markert (100bp DNS létra, Promega) adva.

— Az elektroforézist 120 V-on 30–45 percig végezzük.

▼**M6**

4. *Az amplifikációs termékek láthatóvá tétele*

Ha az ethidium-bromidot a fent leírt módon belefoglaltuk az agaróz gélbe, a DNS-termékeket UV-fényforrás alatt lehet láthatóvá tenni. Alternatív megoldásként az agaróz gélt úgy is meg lehet festeni, hogy a gélt 30 perccel a megjelenítés előtt etídium-bromid híg oldatával (0,5 μg/ml, vízben) lefedjük.

▼M6

11. függelék

Útmutató a tüskés pikó mesterséges megtermékenyítési eljárásához

E szakasz célja, hogy leírja azokat a eljárásokat, amelyek segítségével megtermékenyített ikrák nyerhetők tüskés pikóból az FSDT-ben történő felhasználás céljára.

Eljárások

A hímek spermájának kinyerése

1. Egy, a kívánt populációból származó jól színezett hímet túlaltatunk.

2. A heréket a hal mindkét oldaláról kimetszük. *A herék általában erősen pigmentált, pálcika alakú struktúrák, amelyek kitűnnek a test oldalsó középvonalában*. Az alábbi módszerek egyikét használjuk:

3. Finom ollóval készítsünk egy 1–1,5 cm hosszú bemetszést a kloákától kezdődően egyetlen, körülbelül 45 fokos szögben döntött vágással.

4. Szikével készítsünk egy kis bemetszést a hal oldalában a medencétől kissé posterior irányban és a laterális lemezektől kissé ventrálisan.

5. A heréket finom csipesszel távolítjuk el és Petri-csészébe helyezzük.

6. Minden herét 100 µl frissen készült **Hank-féle végső oldattal** (*) kell befedni.

7. A heréket borotvapengével vagy szikével apró kockákra vágjuk. Ez felszabadítja a spermát, és tejszerű megjelenést kölcsönöz a Hank-féle oldatnak.

8. A spermát tartalmazó folyadékot egy csőbe töltjük, miközben el kell kerülni, hogy a hereszövet darabjai bekerüljenek a pipettába.

9. 800 µl Hank-féle végső oldatot töltünk a csőbe, és jól összekeverjük.

10. Szükség esetén a hím állatot 100 %-os etanollal vagy más fixálóval lehet konzerválni. Ez különösen fontos akkor, ha a vizsgálat az utódokhoz hozzárendeli a szülői eredetet.

Fontos megjegyzés: Bár a legtöbb előírt törzsoldatot előre is el lehet készíteni, az **5. törzsoldatot** és ezt követően a **végső oldatot** frissen, a felhasználás napján kell készíteni.

1. törzsoldat

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Desztillált víz (DW):	100 ml

2. törzsoldat

Na_2HPO_4 (vízmentes)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
DW	100 ml

3. törzsoldat

$CaCl_2$	0,72 g
DW	50 ml

(*) Hank-féle pufferolt sóoldat (HBSS):
A HBSS-re a spermának a megtermékenyítésre való felkészülés alatti megőrzéséhez van szükség.

▼M6

4. törzsoldat

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,23 g
DW	50 ml

5. törzsoldat (frissen készített)

$NaHCO_3$	0,35 g
DW	10 ml

Megjegyzések: Ha a fenti sókból néhány már rendelkezésre áll, de eltérő víztartalommal (pl. $2H_2O$ vízmentes helyett), akkor azt használni lehet, de a tömeget a molekulasúly alapján előbb korrigálni kell.

A Hank-féle végső oldathoz a törzsoldatokat a következő sorrendben kell egyesíteni:

1. törzsoldat	1,0 ml
2. törzsoldat	0,1 ml
3. törzsoldat	0,1 ml
DW	8,6 ml
4. törzsoldat	0,1 ml
5. törzsoldat	0,1 ml

Használat előtt alaposan keverjük össze.

Megtermékenyítés

1. Nagy, gravid nőstényeket azonosítunk be a kívánt populációban; a nőstények csak akkor állnak készen a kipréselésre, ha kitüremkedő peték láthatók a kloákában. A készen álló nőstények jellegzetes „fejjel felfelé” testtartást mutatnak.

2. Óvatosan futtassuk végig egy ujjunkat vagy a hüvelykujjunkat a hal oldalán a farok irányába, hogy elősegítsük egy ikrazsák kilökődését a friss Petri-csészébe. Ismételjük meg a másik oldalon, és tegyük vissza a halat a tartályba.

3. Az ikrákat egy finom ecsettel szét lehet teríteni (hogy egy réteget képezzenek). Fontos, hogy a lehető legtöbb ikrát tegyük ki a spermának, ezért hasznos az ikrafelület maximumra növelése. Fontos megjegyzés: Helyezzünk nedves textilt az ikrák köré, hogy nedvesen tartsa azokat (fontos, hogy az ikrák ne érintkezzenek közvetlenül a vízzel, mert az idő előtt megkeményíti a choriont, ami megakadályozza a megtermékenyítést). Nagy a változékonyság azon a téren, hogy egy nőstény mennyi ikrát képes termelni, de átlagosan mintegy 150 ikrát kell nyerni egy gravid nősténytől.

4. A Hank-féle keverékben elkevert 25 µl spermiumot ecset segítségével egyenletesen szétoszlatjuk az ikrák egész felületén. Ha megkezdődött a megtermékenyítés, a peték gyorsan megkeményednek és megváltozik a színük (egy percen belül). Ha a peték becsült száma meghaladja a 150-et, ismételjük meg az eljárást. Ha a peték nem keményednek meg egy percen belül, adjunk hozzá egy kicsivel több spermát. Fontos megjegyzés: Több sperma hozzáadása nem feltétlenül javítja a megtermékenyítési arányt.

5. A petéket és a spermiumoldatot legalább 15 percig kell hagyni egymásra hatni, és a megtermékenyített petéket 1,5 órával a megtermékenyítés után az expozíciós akváriumokba kell helyezni.

6. Az eljárást megismételjük egy másik nősténnyel, amíg össze nem gyűjtjük a kívánt számú ikrát.

7. Az utolsó tételből tegyünk félre pár ikrát, és rögzítsük 10 %-os ecetsavban.

▼M6

Az ikrák számolása és szétosztása a vizsgálati akváriumokba

1. Az ikrákat egyenletesen kell elosztani az egyes kezelési szintek között, hogy megelőzhető legyen a genetikai torzítás. A megtermékenyített ikrák tételeit egy tompa eszköz használatával (azaz széles szárú rovartani csipesszel vagy oltóhurokkal) azonos méretű csoportokra kell bontani (annyira, ahány kezelési szint van). Ha a kezelésenkénti 4 ismétlést célzozzuk meg ismétlésenként 20 ikrával, akkor expozíciós akváriumonként 80 ikrát kell szétosztani. Fontos megjegyzés: Célszerű további 20 % ikrát hozzáadni (azaz kezelési szintenként 96 ikra legyen), amíg nem vagyunk biztosak benne, hogy 100 %-os megtermékenyítési arányt fogunk elérni.

2. A tüskés pikó ikrái az apák által őrzött fészkeken kívül nagyon fogékonyak a gombás fertőzésekre. Emiatt rendkívül fontos az ikrák metilénkékkel való kezelése a vizsgálat első 5 napja alatt. 1 mg/ml koncentrációjú metilénkék törzsoldatot készítünk és hozzáadjuk az expozíciós akváriumokhoz, hogy 2,125 mg/l maximális végső koncentrációt kapjunk. Fontos megjegyzés: A tüskés pikót a kikelés után nem szabad metilénkéknek kitenni, a rendszernek a 6. naptól metilénkéktől mentesnek kell lennie.

3. Az ikrákat naponta megvizsgáljuk, és az elpusztult vagy meg nem termékenyült ikrákat feljegyezzük. Fontos megjegyzés: Az ikrák a kikelésig soha nem lehetnek vízen kívül, még nagyon rövid időre sem.

▼M6

C.42. BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG TENGERVÍZBEN

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 306. vizsgálati iránymutatásában (1992) leírt módszerrel. Amikor az eredeti vizsgálati módszereket kidolgozták, nem volt ismert, hogy az édesvizet, illetve oltóanyagként kibocsátott szennyvizet vagy eleveniszapot használó gyors biológiai lebonthatósági szűrővizsgálat eredményei milyen mértékben alkalmazhatók a tengeri környezetre. Ebben a kérdésben eltérő eredményekről számoltak be (pl. (1)).

2. Számos – különféle vegyi anyagokat tartalmazó – ipari szennyvíz eléri a tengert, akár közvetlen kibocsátás, akár a folyótorkolatok és a folyók útján, amelyekben a tartózkodási idő rövid ahhoz viszonyítva, mint amennyi idő a jelen lévő számos vegyi anyag teljes biológiai lebomlásához szükséges. Az egyre növekvő felismerés alapján, hogy szükség van a tengeri környezet védelmére a fokozódó vegyianyag-terhelés ellen, illetve hogy szükség van a vegyi anyagok valószínűsíthető tengerbeli koncentrációinak becslésére, vizsgálati módszereket dolgoztak ki a tengervízben történő biológiai lebonthatóság vizsgálatára.

3. Az itt leírt módszerek természetes tengervizet használnak vizes fázisként és a mikroorganizmusok forrásaként egyaránt. Az édesvízi gyors biológiai lebonthatósági módszerekhez való igazodás érdekében megvizsgálták az ultrafiltrált és centrifugált tengervíz használatát, illetve a tengeri üledékek oltóanyagként való használatát is. Ezek a vizsgálatok nem vezettek eredményre. A vizsgálati közeg ezért természetes tengervíz, amelyet a durvaszemcsés részecskék eltávolítása érdekében előkezelünk.

4. A biológiai lebonthatóság lombikrázásos módszerrel történő értékelése érdekében a vizsgált anyag viszonylag magas koncentrációját kell használni az oldott szerves szén (DOC) analitikai módszerének gyenge érzékenysége miatt. Ez viszont szükségessé teszi, hogy a tengervízhez ásványi anyagokat (N és P) adjunk, amelyek alacsony koncentrációja egyébként korlátozná a DOC eltávolítását. A vizsgált anyag koncentrációja miatt a zárt palack módszer esetében is szükséges a tápanyagok hozzáadása.

5. Ezért ezek a módszerek nem a gyors biológiai lebonthatóság vizsgálatai, mivel a tengervízben már jelen lévő mikroorganizmusokon felül semmilyen inokulum hozzáadására nem kerül sor. A vizsgálatok a tengeri környezetet sem szimulálják, mivel tápanyagokat adunk hozzá, illetve a vizsgált anyag koncentrációja sokkal magasabb, mint amilyen a tengerben lenne. Ezen okok miatt a módszereket egy új alszakaszban – „Biológiai lebonthatóság tengervízben” – javasoljuk.

ALKALMAZÁS

6. A vizsgálatok – amelyeket azért végzünk, mert az érintett anyag felhasználási mintája és ártalmatlanítása a tengerbe vezető útvonalat jelzett – eredményei első közelítést nyújtanak a tengervízben történő biológiai lebonthatósággal kapcsolatban. Ha az eredmény pozitív (> 70 % DOC eltávolítása; > 60 % elméleti oxigénigény [EOI]), abból arra lehet következtetni, hogy fennáll a tengeri környezetben történő biológiai lebomlás lehetősége. Ugyanakkor a negatív eredmény nem zárja ki ezt a lehetőséget, de azt jelzi, hogy további vizsgálatok szükségesek, például a vizsgált anyag lehetséges legalacsonyabb koncentrációjának használatával.

▼M6

7. Mindkét esetben, ha egy adott helyszínen határozottabb értékre van szükség a tengervízben történő biológiai lebomlás aránya és mértéke tekintetében, egyéb összetettebb és bonyolultabb – és így költségesebb – módszereket kell alkalmazni. Például szimulációs vizsgálatot lehet végezni a vizsgált anyag olyan koncentrációja alkalmazásával, amely lényegesen közelebb áll a várható környezeti koncentrációhoz. Az érdeklődésre számot tartó helyről vett, ásványi sók hozzáadása nélküli, nem előkezelt tengervizet is lehet használni, és az elsődleges biológiai lebomlást specifikus kémiai elemzés követheti. A biológiai lebonthatóság végső vizsgálatához ^{14}C-vel jelzett anyagokra lenne szükség, hogy az oldható szerves ^{14}C eltűnése és a $^{14}CO_2$ termelése valósághű környezeti koncentrációkon legyen mérhető.

AZ ALKALMAZOTT MÓDSZER MEGVÁLASZTÁSA

8. Az alkalmazandó módszer kiválasztása számos tényezőtől függ; az alábbi táblázat célja, hogy segítsen a választásban. Míg a körülbelül 5 mg C/l alatti vízoldhatóságú anyagokat – legalábbis elvben – nem lehet a lombikrázásos módszerrel vizsgálni, a zárt palack módszerrel a rosszul oldódó anyagok is vizsgálhatók.

Táblázat

A lombikrázásos és a zárt palack módszer előnyei és hátrányai

MÓDSZER	ELŐNYÖK	HÁTRÁNYOK
LOMBIKRÁZÁS	— egyszerű készülékek, kivéve a C-analizátort — a 60 napos időtartam nem probléma — nem zavarja a nitrifikáció — adaptálni lehet az illékony anyagokhoz	— C-analizátorra van szükség — 5–40 mg DOC/1-t használ fel, gátló hatású lehet — nehéz a DOC meghatározása alacsony koncentrációkon a tengervízben (klorid-hatás) — a DOC időnként magas a tengervízben
ZÁRT PALACK	— egyszerű készülékek — egyszerű végű meghatározás — a vizsgált anyag alacsony koncentrációját használja (2 mg/l), így kisebb a gátlás esélye — könnyen adaptálható illékony anyagokhoz	— esetenként nehéz fenntartani a palackok légmentes zárását — a baktériumok falon való növekedése hamis értékekhez vezethet — a vak O_2-felvételi értékek magasak lehetnek, különösen 28 nap elteltével; a tengervíz érlelésével megoldható — lehetséges zavaró hatás a nitrifikáció O_2-felvétele miatt

LOMBIKRÁZÁSOS MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. Ez a módszer az e melléklet C.4B. fejezetében leírt módosított OECD-szűrővizsgálat tengervízre adaptált változata (2). A módszert a Danish Water Quality Institute által az Európai Bizottság (EB) részére szervezett körvizsgálat eredményeként véglegesítették (3).

2. A kapcsolódó tengervizes zárt palack módszerrel megegyezően e vizsgálat eredményeit sem szabad a gyors biológiai lebonthatóság mutatóiként kezelni, hanem kifejezetten az anyagok tengeri környezetben való biológiai lebonthatóságára vonatkozó információk megszerzésére kell használni.

▼M6

A MÓDSZER ELVE

3. A vizsgált anyag előre meghatározott mennyiségét feloldjuk a vizsgálati közegben, hogy 540 mg/l oldott szerves szén (DOC) koncentrációt kapjunk. Ha a szerves szén elemzések érzékenységi határa javul, előnyös lehet a vizsgált anyagok alacsonyabb koncentrációinak használata, különösen a gátló hatású anyagok esetében. A vizsgált anyag vizsgálati közegben készített oldatát rázás közben, sötétben vagy szórt fényben, aerob körülmények mellett, állandó (± 2 °C sávban szabályozott), általában a 15–20 °C tartományon belüli hőmérsékleten inkubáljuk. Olyan esetekben, amikor a vizsgálat célja a környezeti feltételek szimulálása, a vizsgálatok ezen a normál hőmérsékleti tartományon kívül is végezhetők. A vizsgálat ajánlott leghosszabb időtartama mintegy 60 nap. A lebomlást a DOC mérése (végső lebomlás), illetve bizonyos esetekben specifikus elemzés (elsődleges lebomlás) követi.

A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

4. Annak kiderítéséhez, hogy a vizsgálat alkalmazható-e egy adott anyagra, ismerni kell az anyag egyes tulajdonságait. Meg kell állapítani az anyag szerves széntartalmát, az anyag illékonyságának olyan mértékűnek kell lennie, hogy a vizsgálat során ne következzen be jelentős veszteség, valamint a vízoldékonyságának nagyobbnak kell lennie 25–40 mg C/l egyenértékénél. Továbbá a vizsgált anyag nem adszorbeálódhat jelentős mértékben üvegfelületeken. Az elért eredmények értelmezéséhez szükség van a vizsgált anyag tisztaságára, illetve a főbb összetevők egymáshoz viszonyított arányára vonatkozó információkra, különösen, ha az eredmény közel van az „elégséges” szinthez.

5. A vizsgált anyag baktériumokkal szembeni toxicitására vonatkozó információk – például a rövid távú légzési sebesség vizsgálatban mért eredmények (4) – hasznosak lehetnek a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásakor, és nélkülözhetetlenek az alacsony biológiai lebomlási értékek helyes értelmezéséhez. Ez az információ azonban nem mindig elegendő a biológiai lebonthatósági vizsgálatban kapott eredmények értelmezéséhez, és ilyenkor a 18. pontban leírt eljárás a megfelelőbb.

REFERENCIAANYAGOK

6. A tengervíz minta mikrobiális aktivitásának ellenőrzésére megfelelő referenciaanyagokat kell használni. A nátrium-benzoát, a nátrium-acetát és az anilin például felhasználható erre a célra. A referenciaanyagoknak ésszerűen rövid időn belül le kell bomlaniuk, különben ajánlott a vizsgálatot másik tengervízmintával megismételni.

7. Az EK körvizsgálatban, amelyben tengervíz mintákat vettek különböző helyeken és különböző évszakokban (3), a lappangási fázis (t_L) és az 50 százalékos lebomlás eléréséhez szükséges idő (t_{50}) – a lappangási fázist nem számítva – 1–4 nap, illetve 1–7 nap volt nátrium-benzoát esetében. Az anilin esetében a t_L 0–10 nap között, míg a t_{50} 1–10 nap között volt.

A MÓDSZER ISMÉTELHETŐSÉGE ÉS ÉRZÉKENYSÉGE

8. A körvizsgálatban megállapították a módszer ismételhetőségét (3). A vizsgált anyagnak azt a legalacsonyabb koncentrációját, amelyre ez a módszer DOC-elemzéssel használható, javarészt a szerves szén kimutatási határa (jelenleg kb. 0,5 mg C/l), illetve a használt tengervízben oldott szerves szén koncentrációja (általában nagyságrendileg 3–5 mg/l nyílttengeri víz esetében) határozza meg. A DOC háttérkoncentrációja a vizsgált anyag

▼M6

hozzáadása után nem haladhatja meg az összes DOC-koncentráció körülbelül 20 %-át. Ha ez nem megoldható, a DOC háttérkoncentrációját esetenként a tengervíz vizsgálat előtti érlelésével lehet csökkenteni. Ha ezt a módszert csak specifikus kémiai elemzéssel használják (amellyel elsődlegesen lebomlást mérnek), a vizsgálónak kiegészítő információkkal dokumentálnia kell, hogy végső lebonthatóságra lehet számítani. Ezek a kiegészítő információk más gyors vagy inherens biológiai lebonthatósági vizsgálatok eredményei is lehetnek.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

9. A szokásos laboratóriumi készülékek és:

a. Rázógép 0,5–2 literes Erlenmeyer-lombikok részére, automatikus hőmérsékletszabályozással vagy állandó, 15–20 °C hőmérsékletű (± 2 °C tartományon belül szabályozott) helyiségben használva;

b. Szűknyakú, 0,5–2 literes Erlenmeyer-lombikok;

c. Membránszűrő készülék vagy centrifuga;

d. Membránszűrők, 0,2–0,45 μm;

e. Szénanalizátor;

f. Berendezés specifikus elemzésekhez (választható).

Tengervíz

10. Gyűjtsünk tengervízmintát egy alaposan megtisztított tartályba és lehetőleg a gyűjtéstől számított egy-két napon belül szállítsuk el a laboratóriumba. Szállítás közben ne engedjük, hogy a minta hőmérséklete jelentősen meghaladja a vizsgálathoz használt hőmérsékletet. Pontosan azonosítsuk be a mintavételi helyet és írjuk le a szennyezettségi és tápanyagállapotát. Különösen a part menti vizek esetében, a jellemzés tartalmazza a heterotróf mikrobiális telepek számát és az oldott nitrát, ammónium és foszfát koncentrációjának meghatározását.

11. Adjuk meg a következő információkat a tengervízmintára vonatkozóan:

— a gyűjtés dátuma;

— mintavételi mélység;

— a minta megjelenése: zavaros, stb.;

— hőmérséklet a gyűjtés időpontjában;

— sótartalom;

— DOC;

— a gyűjtés és a vizsgálatban történő felhasználás közötti időtartam;

12. Ha a tengervízminta DOC-tartalma magasnak bizonyul (8. pont), használat előtt ajánlott a tengervizet körülbelül egy hétig érlelni. A mintát aerob körülmények között, vizsgálati hőmérsékleten és sötétben vagy szórt fényben történő tárolással lehet érlelni. Szükség esetén enyhe levegőztetéssel tartsuk fenn az aerob feltételeket. Az érlelés alatt a könnyen lebomló

▼M6

szerves anyagok mennyisége csökken. A körvizsgálatban (3) nem találtak kimutatható különbséget az érlelt és a frissen gyűjtött tengervízminták lebontási potenciálja között. Használat előtt a tengervizet a durva részecskék eltávolítása céljából előkezelni kell, pl. nejlon szűrőn vagy durva papírszűrőn keresztüli szűréssel (ne használjunk membrán- vagy GFC-szűrőt), illetve ülepítéssel és dekantálással. Az eljárást jegyzőkönyvezni kell. Az előkezelést az esetleges érlelés után végezzük.

Az ásványi tápanyagok törzsoldatai

13. A következő törzsoldatokat kell készíteni analitikai tisztaságú reagensek segítségével:

a) Kálium-dihidrogén-ortofoszfát, KH_2PO_4 8,50 g

Dikálium-hidrogén-ortofoszfát, K_2HPO_4 21,75 g

Dinátrium-hidrogén-ortofoszfát-dihidrát, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 33,30 g

Ammónium-klorid, NH_4Cl 0,50 g

Oldjuk fel és töltsük fel desztillált vízzel 1 literre.

b) Kalcium-klorid, $CaCl_2$ 27,50 g

Oldjuk fel és töltsük fel desztillált vízzel 1 literre.

c) Magnézium-szulfát-heptahidrát, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

Oldjuk fel és töltsük fel desztillált vízzel 1 literre.

d) Vas(III)klorid-hexahidrát, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

Oldjuk fel és töltsük fel desztillált vízzel 1 literre.

A d) oldatban való csapadékképződést úgy lehet megakadályozni, hogy literenként egy csepp tömény HCl-t vagy 0,4 g etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA, dinátrium-só) adunk hozzá. Ha egy törzsoldatban csapadék képződik, helyettesítsük frissen készített oldattal.

A vizsgálati közeg elkészítése

14. Adjunk a fenti törzsoldatok mindegyikéből 1 ml-t egy liter előkezelt tengervízhez.

Oltóanyag

15. Ne adjunk hozzá semmilyen konkrét oltóanyagot a tengervízben már eleve jelen lévő mikroorganizmusokhoz. Határozzuk meg (választható) a telepképző heterotrófok számát a tengervíz vizsgálati közegben (és lehetőleg az eredeti tengervízmintákban is), pl. a csíraszám segítségével, tengeri agar használatával. Ez különösen kívánatos a parti vagy szennyezett területekről származó minták esetében. A tengervíz heterotróf mikrobiális aktivitását egy referenciaanyaggal végzett vizsgálattal ellenőrizzük.

▼M6

A lombikok előkészítése

16. Győződjünk meg arról, hogy használat előtt minden üvegeszközt lelkiismeretesen megtisztítottunk (pl. alkoholos sósavval), de nem kell feltétlenül sterilizálni, illetve az üvegeszközöket leöblítettük és megszárítottuk annak érdekében, hogy ne következzen be a korábbi vizsgálatokból származó maradványok okozta szennyeződés. A lombikokat az első használat előtt is meg kell tisztítani.

17. A vizsgált anyagokat két lombikban értékeljük egyidejűleg, együtt a referenciaanyagot tartalmazó egyetlen lombikkal. Végezzünk el egy vakpróbát is két példányban – amely sem a vizsgált anyagot, sem a referenciaanyagot nem tartalmazza – az analitikai vak meghatározására. Oldjuk fel a vizsgált anyagokat a vizsgálati közegben – a vizsgált anyagokat kényelmesen hozzáadhatjuk egy tömény törzsoldat segítségével, hogy a kívánt kiindulási koncentrációja kapjuk, amely általában 5–40 mg DOC/l. A referenciaanyagot a szokásos módon vizsgáljuk 20 mg DOC/l-nek megfelelő kiindulási koncentráción. Ha a vizsgált és/vagy referenciaanyagok törzsoldatait használjuk, gondoskodni kell arról, hogy a tengervíz közeg sótartalma nem változott meg nagymértékben.

18. Ha toxikus hatások várhatók vagy azok nem zárhatók ki, tanácsos lehet egy gátlási vizsgálatot is végezni, két példányban, a vizsgálati tervnek megfelelően. Adjuk hozzá a vizsgált és a referenciaanyagot ugyanahhoz az edényhez, és az összehasonlíthatóság érdekében a referenciaanyag koncentrációja általában ugyanaz legyen, mint a kontroll vizsgálatban (azaz 20 mg DOC/l).

19. Adagoljunk megfelelő mennyiségű vizsgálati oldatot Erlenmeyer-lombikokba (a lombik térfogatának legfeljebb körülbelül fele a kényelmes mennyiség), és ezt követően minden lombikot fedjünk le egy laza fedéllel (pl. alumíniumfóliával), amely lehetővé teszi a gázcserét a lombik és a környező levegő között. (A vattadugók nem alkalmasak, ha DOC-elemzést végzünk). Helyezzük az edényeket a rázógépre, és a vizsgálat során óvatos sebességgel (pl. 100 rpm) folyamatosan rázzassuk. Szabályozzuk a hőmérsékletet (15–20 °C és legfeljebb ± 2 °C), és az edényeket az algák növekedésének elkerülése érdekében óvjuk a fénytől. Gondoskodjunk róla, hogy a levegő toxikus anyagoktól mentes legyen.

Fizikai-kémiai kontroll vizsgálat (választható)

20. Ha abiotikus lebomlási vagy veszteségmechanizmusok – mint például hidrolízis (csak a specifikus elemzésnél jelent problémát), párolgás vagy adszorpció – gyanúja merül fel, célszerű elvégezni egy fizikai-kémiai kontroll vizsgálatot. Ez úgy történik, hogy a vizsgált anyaggal együtt higany(II)-kloridot ($HgCl_2$) ([1]) (50–100 mg/l) adunk hozzá az edényekhez, hogy leállítsuk a mikrobiális aktivitást. A DOC vagy a specifikus anyag koncentrációjának jelentős csökkenése a fizikai-kémiai kontroll vizsgálatban abiotikus eltávolítási mechanizmusokat jelez. (Ha higany-kloridot használunk, a DOC-elemzésben figyelembe kell venni az interferenciákat vagy a katalizátormérgezést is.)

A lombikok száma

21. Egy tipikus vizsgálatsorozatban a következő lombikokra van szükség:

1. és 2. lombik	a vizsgált anyagot (vizsgált szuszpenziót) tartalmazza;
3. és 4. lombik	csak tengervizet tartalmaz (vak);
5. lombik	a referenciaanyagot tartalmazza (eljárási kontroll);
6. lombik	a vizsgált és a referencianyagot tartalmazza (toxicitási kontroll) – választható;
7. lombik	a vizsgált anyagot és a sterilizálószert tartalmazza (abiotikus steril kontroll) – választható.

([1]) A higany(II)-klorid ($HgCl_2$) nagyon mérgező anyag, amelyet megfelelő óvintézkedések betartásával kell kezelni. Az e vegyi anyagot tartalmazó vizes hulladékokat nem szabad beengedni a szennyvízrendszerbe, hanem megfelelően ártalmatlanítani kell.

▼M6

DOC-elemzés

22. A vizsgálat során megfelelő időközönként mintákat kell venni a DOC-elemzéshez (1. függelék). A vizsgálat elején (0. nap) és a 60. napon mindig mintát kell venni. Összesen legalább öt mintára van szükség a lebomlás időbeli lefolyásának leírásához. Rögzített menetrend nem állítható fel a mintavételre, mivel a biológiai lebomlás sebessége eltérő lehet. A DOC-meghatározást minden mintán kétszer végezzük el.

Mintavétel

23. A minták szükséges térfogata az analitikai módszertől (specifikus elemzés), a szén-dioxid-elemző készüléktől, és attól az eljárástól (membránszűrés vagy centrifugálás) függ, amelyet a minta szénmeghatározás előtti kezelésére választottunk (lásd a 25. és 26. pontot). A mintavétel előtt gondoskodjunk a vizsgálati közeg alapos összekeveréséről és a lombik falára tapadt bármely anyag leoldásáról vagy szuszpendálásáról.

24. A mintavétel után azonnal végezzünk membránszűrést vagy centrifugálást. Szükség esetén a szűrt vagy centrifugált mintákat 2–4 °C-on legfeljebb 48 órán át, vagy – 18 °C alatt hosszabb ideig tárolhatjuk (ha az anyagról ismert, hogy ettől nem módosul, a pH-t tárolás előtt savasítsuk 2-re).

25. A membránszűrők (0,2–0,45 μm) akkor megfelelők, ha biztosan nem bocsátanak ki szenet és nem is adszorbeálják a szűrési lépés során, pl. polikarbonát membránszűrők. Egyes membránszűrőket a hidrofilizáció érdekében felületaktív anyagokkal impregnálnak, ezért jelentős mennyiségű oldott szenet bocsáthatnak ki. Az ilyen szűrőket ioncserélt vízben három egymást követő perióduson – periódusonként egy órán – át történő forralással kell előkészíteni. Forralás után a szűrőket ioncserélt vízben tároljuk. A szűrlet első 20 ml-ét el kell önteni.

26. A membránszűrés alternatívájaként a minták centrifugálása választható. A mintát 40 000 ms^{-2}-en (~ 4 000 g) centrifugáljuk 15 percig, lehetőleg hűtött centrifugában.

Megjegyzések: Úgy tűnik, hogy az összes szerves szén (TOC) DOC feletti részének (TOC/DOC) centrifugálással történő elkülönítése nagyon kis koncentrációk esetén nem működik, mert a centrifugálás vagy nem távolít el minden baktériumot, vagy a bakteriális plazma részét képező szenet újra feloldja. Magasabb tesztkoncentrációk (> 10 mg C/l) esetén a centrifugálási hiba viszonylag kicsinek tűnik.

A mintavétel gyakorisága

27. Ha az elemzésekre a mintavétel után azonnal sor kerül, a következő mintavételi időpontot az analitikai meghatározás eredményének figyelembevételével becsüljük meg.

28. Ha a mintákat egy későbbi időpontban történő elemzés céljából megőrizzük (24. pont), az előírt minimum ötnél több mintát vegyünk. Először az utolsó mintákat elemezzük, és az elemzéshez a megfelelő mintáknak lépésenként „visszafelé” történő kiválasztásával viszonylag kisszámú analitikai meghatározással jó leírást kaphatunk a biológiai lebomlási görbéről. Ha a vizsgálat végéig nem történt lebomlás, további minták elemzésére nincs szükség, és ebben a helyzetben a „visszafelé” irányuló stratégiával jelentős elemzési költségeket lehet megtakarítani.

▼M6

29. Ha a lebomlási görbén a 60. nap előtt plató figyelhető meg, fejezzük be a vizsgálatot. Amennyiben a lebomlás a 60. napig nyilvánvalóan megkezdődött, de még nem tetőzött, hosszabbítsuk meg a vizsgálatot egy újabb időszakra.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

30. Jegyezzük fel a vizsgálati eredményeket a mellékelt adatlapon (2. függelék), és számítsuk ki a vizsgált és a referenciaanyag biológiai lebomlásának értékét a következő egyenletből:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

ahol:

D_t = lebomlás a DOC százalékában vagy a specifikus anyag eltávolítása a t időpontban,

C_o = a DOC vagy a specifikus anyag kiindulási koncentrációja a vizsgálati közegben,

C_t = a DOC vagy a specifikus anyag koncentrációja a vizsgálati közegben a t időpontban,

$C_{bl(0)}$ = a DOC vagy a specifikus anyag kiindulási koncentrációja a vakpróbában,

$C_{bl(t)}$ = a DOC vagy a specifikus anyag koncentrációja a vakpróbában a t időpontban.

31. A lebomlást a DOC eltávolításának százalékában (végső lebomlás) vagy a specifikus anyag eltávolításának százalékában (elsődleges lebomlás) állapítsuk meg a t időpontban. Számítsuk ki a DOC-koncentrációt a legközelebbi 0,1 mg/l-re kerekítve, és a D_t értékek átlagát kerekítsük fel a legközelebbi egész százalékra.

32. Ábrázoljuk grafikusan a lebomlási görbét egy diagramban az „Érvényesség és az eredmények értelmezése” című részben található ábra szerint. Ha elegendő adat áll rendelkezésre, számítsuk ki a görbéből a lappangási fázist (t_L) és a lappangási fázis végétől az 50 százalékos eltávolítás eléréséig szükséges időt (t_{50}).

Vizsgálati jegyzőkönyv

33. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

— fizikai tulajdonság és adott esetben a fizikai-kémiai tulajdonságok;

— azonosító adatok.

Vizsgálati feltételek:

— a mintavételi hely és leírása; szennyezettségi és tápanyagállapot (adott esetben csíraszám, nitrát, ammónium, foszfát);

— a minta jellemzői (a mintavétel időpontja, mélység, megjelenés, hőmérséklet, sótartalom, DOC (opcionális), a gyűjtés és a vizsgálati felhasználás közötti időtartam);

▼M6

— a tengervíz érlelésére alkalmazott módszer (ha van ilyen);

— a tengervíz előkezelésére használt módszer (szűrés/ülepítés);

— a DOC meghatározásához használt módszer;

— a specifikus elemzésre használt módszer (választható);

— a tengervízben lévő heterotrófok számának meghatározására használt módszer (csíraszám módszer vagy egyéb eljárás) (választható);

— a tengervíz jellemzésére használt egyéb módszerek (ATP mérés, stb.) (választható).

Eredmények:

— az adatlapon jegyzőkönyvezett analitikai adatok (2. függelék);

— a lebomlási vizsgálat menete egy diagramban grafikusan ábrázolva, amely bemutatja a lappangási fázist (t_L), az emelkedést, valamint az 50 százalékos eltávolításhoz (a lappangási fázis végétől kezdve) szükséges időt (t_{50}). A lappangási fázist grafikusan lehet megbecsülni, amint az az „Érvényesség és az eredmények értelmezése” című szakaszban található ábrán látható, vagy egyszerűen a 10 százalékos csökkenéshez szükséges időt lehet lappangási fázisnak tekinteni;

— a 60 nap után vagy a vizsgálat végén mért százalékos lebomlás.

Az eredmények szöveges értékelése.

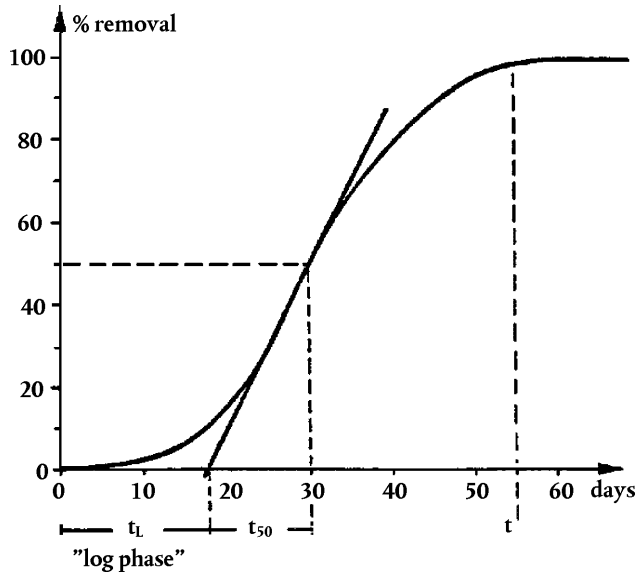
Érvényesség és az eredmények értelmezése

34. A referenciaanyaggal – pl. nátrium-benzoát, nátrium-acetát vagy anilin – kapott eredményeknek összehasonlíthatónak kell lenniük a körvizsgálatban (3) kapott eredményekkel (lásd: a „Referenciaanyagok” című szakaszt, 7. pont). Ha a referenciaanyaggal kapott eredmények atipikusak, a vizsgálatot másik tengervízmintával meg kell ismételni. Bár a gátlási vizsgálatok eredményeit nem mindig egyszerű megítélni, mivel a vizsgált anyag is hozzájárul a DOC mennyiségéhez, a teljes DOC eltávolítási arány kontrolhoz vizsonyított jelentős csökkenése toxikus hatásra utaló pozitív jel.

35. A legtöbb természetes rendszerhez képest viszonylag magas vizsgálati koncentrációk (és ennek következtében a vizsgált anyagok és az egyéb szénforrások koncentrációja közötti kedvezőtlen arány) miatt a módszert előzetes vizsgálatnak kell tekinteni, amely annak jelzésére használható, hogy az anyag könnyen lebontható vagy sem. Ennek megfelelően az alacsony eredmény nem feltétlenül jelenti azt, hogy a vizsgált anyag nem bontható le a tengeri környezetben, hanem azt jelzi, hogy további vizsgálatokra van szükség ennek megállapításhoz.

Az alábbi ábra egy példát mutat be az elméleti lebomlási vizsgálatra, és illusztrálja a t_L-érték (a „lappangási fázis” hossza), illetve a t_{50}-érték (a t_L-lel kezdődő időintervallum), azaz az 50 százalékos eltávolítás eléréséhez szükséges időtartam becslésének egyik lehetséges módját.

▼M6



ZÁRT PALACK MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. Ez a módszer a zárt palack vizsgálat (5) tengervízre adaptált változata, amelyet a dán Water Quality Institute által az Európai Bizottság (EB) részére szervezett körvizsgálat eredményeként véglegesítettek (3).

2. A kapcsolódó tengeri lombikrázásos módszerrel megegyezően e vizsgálat eredményeit sem lehet a gyors biológiai lebonthatóságra utaló jelzésként értelmezni, hanem kifejezetten az anyagok tengeri környezetben való lebonthatóságára vonatkozó információk megszerzésére kell használni.

A MÓDSZER ELVE

3. A vizsgált anyag előre meghatározott mennyiségét feloldjuk a vizsgálati közegben, általában literenként 2–10 mg vizsgált anyag koncentrációban (egy vagy több koncentráció is használható). Az oldatot a megtöltött zárt üvegben, sötétben, állandó hőmérsékletű fürdőben vagy helyiségben, ± 1 °C-on belül szabályozott 15–20 °C közötti hőmérsékleten tartjuk. Azokban az esetekben, amikor a vizsgálat célja a környezeti feltételek szimulálása, a vizsgálatot ezen a normál hőmérsékleti tartományon kívül is lehet végezni, feltéve, hogy megtesszük a szükséges kiigazításokat a hőmérséklet szabályozása érdekében. A lebomlást az oxigén elemzése követi egy 28 napos időszakon keresztül.

4. A körvizsgálat megmutatta, hogy ha a vizsgálatot 28 napon túlra is kiterjesztjük, a legtöbb esetben nem lehet hasznos információkat gyűjteni a súlyos interferenciák miatt. A vak biológiai oxigénigény (BOI) értékei túlzottan magasak voltak, valószínűleg a mikroorganizmusoknak a palack falára – a keverés hiánya miatt – történő ránövekedése, illetve a nitrifikáció következtében. Ezért a javasolt időtartam 28 nap, de ha a vak BOI érték a 30 %-os határon belül marad (15. és 40. pont), a vizsgálatot meg lehet hosszabbítani.

A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

5. Annak kiderítéséhez, hogy a vizsgálat alkalmazható-e egy adott anyagra, ismerni kell az anyag egyes tulajdonságait. A tapasztalati képletre azért van szükség, hogy ki lehessen számítani az elméleti oxigénigényt (EOI) (lásd a 3. mellékletet); ellenkező esetben a kémiai oxigénigényt (KOI) kell meghatározni referenciaértékként. A KOI használata kevésbé kielégítő, mivel egyes anyagok nem oxidálódnak teljesen a KOI-vizsgálatban.

▼M6

6. Az anyag oldhatósága legyen legalább 2 mg/l, bár elvben a kevésbé oldható anyagokat is lehet vizsgálni (pl. ultrahangos kezelés segítségével), illetve az illékony anyagokat is. Az elért eredmények értelmezéséhez szükség van a vizsgált anyag tisztaságára, illetve a főbb összetevők egymáshoz viszonyított arányára vonatkozó információkra, különösen, ha az eredmény közel van az „elégséges” szinthez.

7. Az anyag baktériumokkal szembeni toxicitására vonatkozó információk – például a rövid távú légzési vizsgálatban mért eredmények (4) – nagyon hasznosak lehetnek a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásakor, és nélkülözhetetlenek az alacsony biológiai lebomlási értékek helyes értelmezéséhez. Ez az információ azonban nem mindig elegendő a biológiai lebonthatósági vizsgálatban kapott eredmények értelmezéséhez, és ilyenkor a 27. pontban leírt eljárás a megfelelőbb.

REFERENCIAANYAGOK

8. A tengervízminta mikrobiális aktivitásának ellenőrzésére megfelelő referenciaanyagokat kell használni. Az anilint, a nátrium-acetátot vagy a nátrium-benzoátot (például) lehet használni erre a célra. Ezen anyagok legalább 60 százalékos lebomlásának (az EOI-hoz viszonyítva) kell bekövetkeznie ésszerűen rövid időn belül, különben ajánlott a vizsgálatot másik tengervízmintán megismételni.

9. Az EK-körvizsgálatban, amelynek keretében tengervíz mintákat vettek különböző helyeken és különböző évszakokban, nátrium-benzoát esetében a lappangási fázis (t_L) 0–2 nap, az 50 százalékos lebomlás eléréshez szükséges idő (t_{50}) a lappangási fázis nélkül pedig 1–4 nap volt. Az anilin esetében a t_L és a t_{50} érték 0–7, illetve 2–12 nap volt.

REPRODUKÁLHATÓSÁG

10. Az EK-körvizsgálatban megállapították a módszer reprodukálhatóságát (3).

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

11. Szokásos laboratóriumi berendezések, és:

a) 250–300 ml-es BOI-palackokat lehet használni üvegdugóval vagy szűknyakú 250 ml-es palackokat üvegdugóval;

b) Több 2, 3 és 4 literes palack liter beosztással a kísérlet előkészítéséhez és a BOI-palackok feltöltéséhez;

c) Vízfürdő vagy állandó hőmérsékletű helyiség a palackok állandó hőmérsékleten (± 1 °C) és fénytől védve történő tárolásához.

d) Berendezés az oldott oxigén elemzésére;

e) Membránszűrők, 0,2–0,45 μm (választható);

f) Berendezés specifikus elemzésekhez (választható).

Tengervíz

12. Gyűjtsünk tengervízmintát egy alaposan megtisztított tartályba és lehetőleg a gyűjtéstől számított egy-két napon belül szállítsuk el a laboratóriumba. Szállítás közben ne engedjük, hogy a minta hőmérséklete jelentősen meghaladja a vizsgálathoz használt hőmérsékletet.

▼M6

13. Pontosan azonosítsuk be a mintavételi helyet és írjuk le a szennyezettségi és tápanyagállapotát. Különösen a part menti vagy szennyezett vizek esetében, a jellemzés tartalmazza a heterotróf mikrobiális telepek számát és az oldott nitrát, ammónium és foszfát koncentrációjának meghatározását.

14. Adjuk meg a következő információkat a tengervíz mintára:

— a gyűjtés dátuma;

— mintavételi mélység;

— a minta megjelenése: zavaros, stb.;

— hőmérséklet a gyűjtés időpontjában;

— sótartalom;

— oldott szerves szén (DOC);

— a gyűjtés és a vizsgálatban történő felhasználás közötti időtartam;

15. Ha a minta DOC-tartalmát magasnak találjuk, vagy ha úgy véljük, hogy a vak BOI 28 nap után meghaladná a referenciaanyag BOI értékének 30 százalékát, ajánlott a tengervizet felhasználás előtt körülbelül egy hétig érlelni.

16. A mintát aerob feltételek mellett, a vizsgálati hőmérsékleten és sötétben vagy szórt fényben történő tárolással lehet érlelni. Szükség esetén enyhe levegőztetéssel tartsuk fenn az aerob körülményeket. Az érlelés alatt a könnyen lebomló szerves anyagok mennyisége csökken. A körvizsgálatban (3) nem találtak kimutatható különbséget az érlelt és a frissen gyűjtött tengervízminták lebontási potenciálja között.

17. Használat előtt a tengervizet a durva részecskék eltávolítása céljából előkezelni kell, pl. nejlon szűrőn vagy durva papírszűrőn keresztüli szűréssel (ne használjunk membrán- vagy GFC-szűrőt), illetve ülepítéssel és dekantálással. Az alkalmazott eljárást jegyzőkönyvezni kell. Az előkezelést az esetleges érlelés után végezzük.

Az ásványi tápanyagok törzsoldatai

18. A következő törzsoldatokat kell elkészíteni analitikai tisztaságú reagensek segítségével.

a)	Kálium-dihidrogén-ortofoszfát, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikálium-hidrogén-ortofoszfát, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinátrium-hidrogén-ortofoszfát-dihidrát, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Ammónium-klorid, NH_4Cl	0,50 g
	Oldjuk fel és töltsük fel desztillált vízzel 1 literre.	
b)	Kalcium-klorid, $CaCl_2$	27,50 g
	Oldjuk fel és töltsük fel desztillált vízzel 1 literre.	
c)	Magnézium-szulfát-heptahidrát, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Oldjuk fel és töltsük fel desztillált vízzel 1 literre.	
d)	Vas(III)klorid-hexahidrát, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Oldjuk fel és töltsük fel desztillált vízzel 1 literre.	

▼M6

A d) oldatban való csapadékképződést úgy lehet megakadályozni, hogy literenként egy csepp tömény HCl-t vagy 0,4 g etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA, dinátrium-só) adunk hozzá. Ha egy törzsoldatban csapadék képződik, helyettesítsük frissen készített oldattal.

A vizsgálati közeg elkészítése

19. Adjunk a fenti törzsoldatok mindegyikéből 1 ml-t egy liter előkezelt tengervízhez. A vizsgálati hőmérsékleten tiszta sűrített levegővel körülbelül 20 percig történő levegőztetéssel telítsük a vizsgálati közeget levegővel. Határozzuk meg az oldott oxigén koncentrációját ellenőrzés céljából. Az oldott oxigén telített koncentrációját a sótartalom és a hőmérséklet függvényében az e vizsgálati módszerhez mellékelt nomogramról lehet olvasni (4. függelék).

Oltóanyag

20. Ne adjunk hozzá semmilyen konkrét oltóanyagot a tengervízben már jelen lévő mikroorganizmusokhoz. Határozzuk meg (választható) a telepképző heterotrófok számát a tengervíz vizsgálati közegben (és lehetőleg az eredeti tengervízmintában is), pl. a csíraszám segítségével, tengeri agar használatával. Ez különösen kívánatos a parti vagy szennyezett területekről származó minták esetében. A tengervíz heterotróf mikrobiális aktivitását egy referenciaanyaggal végzett vizsgálattal ellenőrizzük.

A vizsgálati palackok előkészítése

21. Az összes szükséges beavatkozást, egyebek mellett a tengervíz érlelését és előkezelését a kiválasztott 15–20 °C vizsgálati hőmérsékleten kell végezni, biztosítva az üvegeszközök tisztaságát (de az üvegeszközöknek nem kell sterilnek lenniük).

22. A BOI-palackokból csoportokat kell készíteni a vizsgált és a referenciaanyagok BOI értékének meghatározására végzett egyidejű kísérletsorozatokhoz. Az elemzéseket a két ismétlésen kell elvégezni (vak, referencia- és vizsgált anyag), azaz minden meghatározáshoz két palackot kell előkészíteni. Elemzéseket legalább a 0., 5., 15. és 28. napon végzünk (négy meghatározás). Az oxigénelemzések esetében a négy meghatározáshoz összesen $3 \times 2 \times 4 = 24$ palackra (vak, referencia- és vizsgált anyag), és így körülbelül 8 liter vizsgálati közegre van szükség (a vizsgált anyag egy koncentrációjához).

23. A vizsgált és referenciaanyagból külön oldatokat készítünk megfelelő térfogatú nagy palackokban (11. pont), a vizsgált és a referenciaanyagot a részben megtöltött nagy palackokhoz hozzáadva, közvetlenül vagy koncentrált törzsoldat használatával. Ezután további vizsgálati közeget adunk hozzá a kívánt végső koncentráció eléréséhez. Ha a vizsgált és/vagy referenciaanyagok törzsoldatait használjuk, gondoskodni kell arról, hogy a tengervíz közeg sótartalma nem változott meg jelentős mértékben.

24. A vizsgált és a referenciaanyag koncentrációit a következők figyelembevételével kell kiválasztani:

a) az oldott oxigén tengervízben való oldhatósága a mindenkori vizsgálati hőmérsékleten és sótartalom mellett (lásd a mellékelt nomogramot, 4. függelék);

b) a tengervíz vak BOI értéke; és

c) a vizsgált anyag várható biológiai lebomlása.

▼M6

25. 15 °C és 20 °C hőmérsékleten, illetve 32 ezrelék sótartalom mellett (óceáni víz) az oldott oxigén oldhatósága körülbelül 8,1, illetve 7,4 mg/l. Ha a tengervizet nem érleltük, a tengervíz saját oxigénfogyasztása (vak légzés) 2 mg O_2/l vagy annál több lehet. Ezért annak érdekében, hogy a vizsgált anyag oxidálását követően jelentős oxigénkoncentráció maradjon vissza, a vizsgált anyag kiindulási koncentrációja körülbelül 2–3 mg/l legyen (az EOI-tól függően) olyan anyagok esetében, amelyek a vizsgálati körülmények között várhatóan teljesen lebomlanak (mint például a referenciaanyagok). A kevésbé lebontható anyagokat magasabb, legfeljebb körülbelül 10 mg/l koncentrációban kell vizsgálni, feltéve, hogy toxikus hatás nem fordul elő. Előnyös lehet párhuzamos vizsgálatokat futtatni a vizsgált anyag alacsony (körülbelül 2 mg/l) és a magas (körülbelül 10 mg/l) koncentrációjával.

26. Az oxigén vakpróbát párhuzamosan kell vizsgálni olyan palackokban, amelyek sem vizsgált, sem referenciaanyagot nem tartalmaznak.

27. Ha gátló hatás nem állapítható meg, a következő oldatsorozatot kell készíteni külön nagy üvegekben (13):

a) 2 mg/l egy könnyen lebomló anyagból, pl. bármelyik említett referenciaanyagból;

b) x mg/l a vizsgált anyagból (az x rendszerint 2);

c) 2 mg/l egy könnyen lebomló anyagból plusz x mg/l a vizsgált anyagból.

Fizikai-kémiai kontroll vizsgálat (választható)

28. Ha élünk a specifikus elemzések lehetőségével, fizikai-kémiai vizsgálatot lehet végezni annak ellenőrzésére, hogy a vizsgált anyagot eltávolítják-e abiotikus mechanizmusok, például hidrolízis vagy adszorpció. A fizikai-kémiai vizsgálat úgy történik, hogy a vizsgált anyaggal együtt higany(II)-kloridot ($HgCl_2$) ([1]) (50–100 mg/l) adunk hozzá dupla palackokhoz, hogy leállítsuk a mikrobiális aktivitást. A specifikus anyag koncentrációjának jelentős csökkenése a vizsgálat során abiotikus eltávolítási mechanizmusokat jelez.

A BOI-palackok száma egy tipikus vizsgálatsorozatban

29. Egy tipikus vizsgálatsorozatban a következő palackokra van szükség:

— legalább 8 palack a vizsgált anyaggal;

— legalább 8 palack csak tápanyagokkal dúsított tengervízzel;

— legalább 8 palack referenciaanyaggal, és ha szükséges,

— 6 palack a vizsgált és a referenciaanyaggal (toxicitási kontroll).

ELJÁRÁS

30. Elkészítés után minden oldatból azonnal ki kell szívni a BOI-palackok megfelelő csoportjának feltöltéséhez szükséges mennyiséget a megfelelő nagy üveg alsó negyedéből (nem alulról). A zéró kontrollokat azonnal elemezni kell oldott oxigénre (zéró időpont, 33. pont), vagy pedig $MnCl_2$-vel (mangán(II)-klorid) és NaOH-val (nátrium-hidroxid) végzett kicsapatással tartósítani kell későbbi kémiai elemzés céljára.

([1]) A higany(II)-klorid ($HgCl_2$) nagyon mérgező anyag, amelyet megfelelő óvintézkedések betartásával kell kezelni. Az e vegyi anyagot tartalmazó vizes hulladékokat nem szabad beengedni a szennyvízrendszerbe, hanem megfelelően ártalmatlanítani kell.

▼M6

31. A megmaradt párhuzamos BOI-palackokat vizsgálati hőmérsékleten (15–20 °C) inkubáljuk, sötét helyen tartjuk, megfelelő időközönként (például minimum az 5., a 15. és a 28. nap után) eltávolítjuk az inkubációs területről, és elemezzük az oldott oxigéntartalmukat (33. pont).

32. A specifikus elemzésekre (választható) szolgáló mintákat membránszűrjük (0,2–0,45 μm), vagy 15 percig centrifugáljuk. Ha a mintákat nem analizáljuk azonnal, 2–4 °C-on legfeljebb 48 órán át, vagy – 18 °C-on hosszabb ideig tárolhatjuk (ha ismeretes, hogy az anyag ettől nem módosul, a pH-t tárolás előtt savasítsuk 2-re).

Az oldott oxigén meghatározása

33. Az oldott oxigén koncentrációját nemzeti vagy nemzetközi szinten elismert kémiai vagy elektrokémiai módszerrel kell meghatározni.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

34. Az analitikai eredményeket a mellékelt adatlapon kell feljegyezni (5. függelék).

35. A BOI értéke az oxigénfogyásnak a vakpróba és a vizsgált anyag oldata közötti különbsége a vizsgálat körülményei között mérve. A nettó oxigénfogyást el kell osztani a vizsgált anyag koncentrációjával (tömeg/térfogat) annak érdekében, hogy a BOI-t mg BOI/mg vizsgált anyag formában lehessen kifejezni. A lebomlás a biokémiai oxigénigénynek lehetőleg az elméleti oxigénigényhez (EOI), vagy pedig a kémiai oxigénigényhez (KOI) viszonyított aránya, és százalékban kell kifejezni (lásd a 36. pontot).

36. A biológiai lebomlás értéke az egyes mintavételi időpontokban a vizsgált és a referenciaanyagra az alábbi egyenletek egyikével számolható ki:

$$\%\ biológiai\ lebomlás = \frac{mg\ O_2/mg\ vizsgált\ anyag}{mg\ EOI/mg\ vizsgált\ anyag} \times 100$$

$$\%\ biológiai\ lebomlás = \frac{mg\ O_2/mg\ vizsgált\ anyag}{mg\ KOI/mg\ vizsgált\ anyag} \times 100$$

ahol:

EOI = az elméleti oxigénigény (számítását lásd a 3. függelékben)

KOI = a kísérleti úton meghatározott kémiai oxigénigény.

Megjegyzés: Előfordul, hogy a két számítási módszer (az EOI százaléka vagy a KOI százaléka) nem ugyanazt az eredményt adja; célszerű az EOI-t használni, mert bizonyos anyagok nem teljesen oxidálódnak a KOI-vizsgálatban.

37. A lebomlás folyamatát grafikusan, diagram formájában kell ábrázolni (lásd az „Érvényesség és az eredmények értelmezése” című szakaszban található példát). Ha elegendő adat áll rendelkezésre, a biológiai lebomlási görbéből kiszámítjuk a lappangási fázis hosszát (t_L) és a lappangási fázis végétől az 50 százalékos eltávolítás eléréséig szükséges időt (t_{50}).

38. Ha specifikus elemzést végzünk (választható), az elsődleges lebomlás százalékos arányát a specifikus anyagnak a vizsgálati időszakban megfigyelt, az analitikai vakpróbákkal korrigált eltávolítása százalékos arányaként kell kifejezni.

▼M6

Vizsgálati jegyzőkönyv

39. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

— fizikai jelleg és adott esetben a fizikai-kémiai tulajdonságok;

— azonosító adatok.

Vizsgálati feltételek:

— a mintavételi hely és leírása: szennyezettségi és tápanyagállapot (adott esetben csíraszám, nitrát, ammónium, foszfát);

— a minta jellemzői (a mintavétel időpontja, mélység, megjelenés, hőmérséklet, sótartalom, DOC [választható], a gyűjtés és a vizsgálatban való felhasználás közötti időtartam);

— a tengervíz érlelésére alkalmazott módszer (ha van ilyen);

— a tengervíz előkezelésére használt módszer (szűrés/ülepítés);

— a KOI meghatározására használt módszer (ha elvégeztük);

— az oxigén mérésére használt módszer;

— a diszperziós eljárás olyan anyagok esetében, amelyek rosszul oldódnak a vizsgálati körülmények között;

— a tengervízben lévő heterotrófok számának meghatározására használt módszer (csíraszámmódszer vagy egyéb eljárás);

— a DOC tengervízben történő meghatározására használt módszer (választható);

— a specifikus elemzésre használt módszer (választható);

— egyéb választható módszerek a tengervíz jellemzésére (ATP-mérés, stb.).

Eredmények:

— az adatlapon jegyzőkönyvezett analitikai adatok (5. függelék);

— a lebomlási vizsgálat menete egy diagramban grafikusan ábrázolva, amely bemutatja a lappangási fázist (t_L), az emelkedést, valamint a vizsgált anyag oxidációja által okozott végső oxigénfelvétel 50 százalékának eléréséhez szükséges t_{50} időt (a lag fázis végétől számítva). A lappangási fázist grafikusan lehet megbecsülni, amint a mellékelt ábrán látható, vagy egyszerűen a 10 százalékos lebomláshoz szükséges időt lehet lappangási fázisnak tekinteni;

— százalékos lebomlás 28 nap után mérve.

Az eredmények szöveges értékelése.

Érvényesség és az eredmények értelmezése

40. A vak légzés nem haladhatja meg a vizsgálati palackban lévő oxigén 30 százalékát. Ha ezt a kritériumot frissen gyűjtött tengervíz használata esetén nem lehet teljesíteni, a tengervizet használat előtt érlelni (stabilizálni) kell.

41. Figyelembe kell venni azt a lehetőséget, hogy a nitrogéntartalmú anyagok befolyásolhatják az eredményeket.

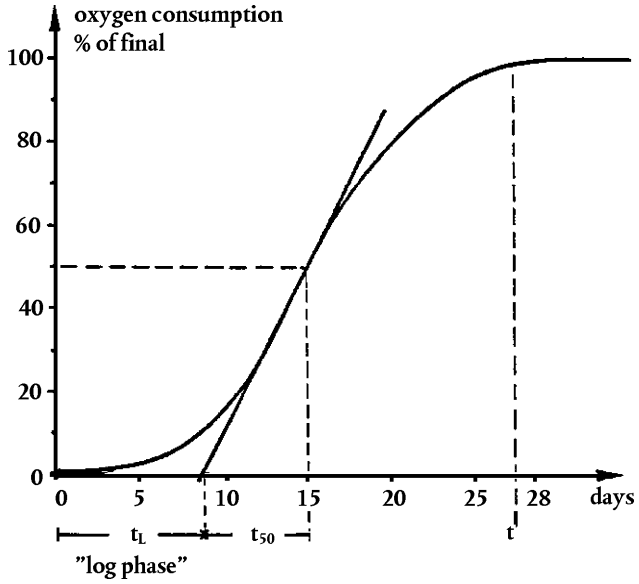
▼M6

42. A nátrium-benzoát és az anilin referenciaanyaggal kapott eredményeknek összehasonlíthatónak kell lenniük a körvizsgálatban (3) kapott eredményekkel (9. pont). Ha a referenciaanyaggal kapott eredmények atipikusak, a vizsgálatot másik tengervízmintával meg kell ismételni.

43. A vizsgált anyagot gátló hatásúnak lehet tekinteni baktériumokra (a használt koncentrációban), ha a referencia- és a vizsgált anyag keverékének BOI-értéke kisebb, mint a két anyag különálló oldatai BOI-értékének összege.

44. A legtöbb természetes rendszerhez képest viszonylag magas vizsgálati koncentrációk – és ennek következtében a vizsgált anyag és az egyéb szénforrások koncentrációja közötti kedvezőtlen arány – miatt a módszert előzetes vizsgálatnak kell tekinteni, amely annak jelzésére használható, hogy az anyag könnyen lebontható-e vagy sem. Ennek megfelelően az alacsony eredmény nem feltétlenül jelenti azt, hogy a vizsgált anyag nem bontható le a tengeri környezetben, hanem azt jelzi, hogy további vizsgálatokra van szükség ennek megállapításhoz.

Az alábbiakban egy példa látható az elméleti lebomlási vizsgálatra, amely illusztrálja a t_L érték (a „lappangási fázis” hossza), illetve a t_{50} érték (a t_L-lel kezdődő időintervallum), azaz a vizsgált anyag oxidációja által okozott végső oxigénfelvétel 50 %-ának eléréséhez szükséges időtartam becslésének egyik lehetséges módját.



SZAKIRODALOM

(1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. Chemosphere, 10 (6); 561-573.

(2) E melléklet C.4-B. fejezete: A „gyors” biológiai lebonthatóság meghatározása, III. rész: Módosított OECD szűrővizsgálat

(3) Nyholm N. and Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, March 1987, Commission of the European Communities.

(4) E melléklet C.11. fejezete: Biológiai lebomlás – Eleveniszap légzésgátló hatásának vizsgálata.

(5) E melléklet C.4-E. fejezete: A „gyors” biológiai lebonthatóság meghatározása, VI. rész: Zártpalack-módszer.

▼M6

1. függelék

A szerves szén meghatározása tengervízben

LOMBIKRÁZÁSOS MÓDSZER

A szerves szén vízmintában történő meghatározásához a minta szerves vegyületeit szén-dioxiddá oxidáljuk általában az alábbi három technika valamelyikének használatával:

— nedves oxidáció perszulfáttal/UV-besugárzással;

— nedves-oxidáció perszulfáttal/megemelt hőmérsékleten (116–130 °C);

— égetés.

A képződött CO_2 mennyiségét infravörös spektroszkópiával vagy titrimetriával határozzuk meg. Alternatív megoldásként a CO_2-ot metánná redukáljuk, amelynek mennyiségét lángionizációs detektoron (flame ionization detector, FID) határozzuk meg.

A perszulfát/UV-módszert gyakran használjuk az alacsony szemcsésanyag-tartalmú „tiszta” víz elemzéséhez. Az utóbbi két módszert a vízminták legtöbb típusánál alkalmazni lehet, a perszulfáttal/megemelt hőmérsékleten történő oxidáció az alacsony szintű minták esetén a leginkább alkalmas, míg az égetéses eljárás az 1 mg C/l értéket jóval meghaladó mennyiségű nem illékony szerves szenet (non-volatile organic carbon, NVOC) tartalmazó minták vizsgálatára alkalmas.

Zavaró hatások

Mindhárom módszer eredményessége a mintában jelen lévő szervetlen szén (inorganic carbon, IC) eltávolításától vagy kompenzálásától függ. Az IC eltávolítására leggyakrabban használt módszer a CO_2 savanyított mintából való kitisztítása, bár ez az illékony szerves vegyületek elvesztését is eredményezi (1). Az IC teljes eltávolítását vagy kompenzálását minden mintamátrix esetében biztosítani kell, és a minta típusától függően az NVOC mellett az illékony szerves szenet (volatile organic carbon, VOC) is meg kell határozni.

A perszulfát/UV-módszer használata esetén a magas kloridkoncentráció az oxidáció hatékonyságának csökkenését eredményezi (2). A higany(II)-nitrát hozzáadásával módosított oxidációs reagens alkalmazása azonban megszüntetheti ezt a zavaró hatást. Ajánlott a maximális tolerálható mintatérfogatot használni bármilyen típusú klorid-tartalmú minta értékeléséhez. Az égetéses módszerrel elemzett minta magas sókoncentrációja sóbevonat képződését idézheti elő a katalizátoron, illetve az égetőcső túlzott korrózióját okozhatja. Meg kell tenni a gyártó kézikönyve szerinti óvintézkedéseket.

A perszulfát/UV-módszer alkalmazása esetén erősen zavaros, illetve szemcsés anyagot tartalmazó minták esetében tökéletlen oxidáció következhet be.

Példa a megfelelő módszerre

A nem illékony szerves szenet a perszulfát/UV-besugárzás módszerrel végzett oxidációval határozzuk meg, a kialakult CO_2 ezt követő mennyiségi meghatározása pedig nem diszperzív infravörös spektrometria alkalmazásával történik.

Az oxidációs reagenst a (2) szakirodalmi hivatkozásban megadott javaslatoknak megfelelően módosítjuk, a gyártó kézikönyvében leírtak szerint:

a) 8,2 g $HgCl_2$-t és 9,6 g $Hg(NO_3)_2.H_2O$-t feloldunk több száz milliliter alacsony szén-dioxid koncentrációjú reagensvízben.

b) 20 g $K_2S_2O_8$-t feloldunk a higanyos sóoldatban.

▼**M6**

c) 5 ml HNO_3-t (konc.) adunk az elegyhez.

d) a reagenst felhígítjuk 1 000 ml-re.

A klorid okozta zavaró hatást úgy szüntetjük meg, hogy 40 µl mintatérfogatot használunk 10 százalék klorid, illetve 200 µl mintatérfogatot 1,9 százalék klorid esetén. A magas kloridkoncentrációjú és/vagy nagyobb térfogatú minták e módszer szerint elemezhetők, feltéve, hogy megakadályozzuk a klorid felszaporodását az oxidációs edényben. Ezután lehet elvégezni a kérdéses minta illékony szerves széntartalmának meghatározását, ha szükséges.

SZAKIRODALOM

(1) ISO, Water quality – determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, January 16, 1986.

(2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Also of interest (gives a description of an autoanalysis system):

(3) Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.

▼M6

2. függelék

Biológiai lebomlás tengervízben

LOMBIKRÁZÁSOS MÓDSZER

ADATLAP

1. **LABORATÓRIUM:**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA:**

3. **VIZSGÁLT ANYAG:**

Név:

Törzsoldat koncentrációja:	mg/l az anyagra vonatkoztatva
Kezdeti koncentráció a közegben, t_o:	mg/l az anyagra vonatkoztatva
	mg DOC/l

4. **TENGERVÍZ:**

Forrás:

Gyűjtés időpontja:

Mintavételi mélység:

Megjelenés a gyűjtés időpontjában (pl. zavaros, stb.):

Sótartalom a gyűjtéskor:	‰
Hőmérséklet a gyűjtéskor:	°C
DOC „x” órával a gyűjtés után:	mg/l

Előkezelés vizsgálat előtt (pl. szűrés, ülepítés, érlelés, stb.):

Mikrobiális telepek száma	— eredeti minta:	telep/ml
	— a vizsgálat kezdetén	telep/ml

Egyéb jellemzők:

5. **SZÉNMEGHATÁROZÁS:**

Szénanalizátor:

	Lombik száma		DOC n nap után (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Vizsgálat: tápanyag-dúsított tengervíz vizsgált anyaggal	1	a_1					
		a_2					
		átlag, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		átlag, $C_{b(t)}$					

▼**M6**

	Lombik száma		DOC n nap után (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Vak: tápanyag-dúsított tengervíz vizsgált anyag nélkül	1	c_1					
		c_2					
		átlag, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		átlag, $C_{d(t)}$					
	átlag, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **A NYERS ADATOK KIÉRTÉKELÉSE:**

Lombik száma	Az eredmények kiszámítása	% lebomlás n nap után				
		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				
Átlag (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) A D_1 és D_2 jelentős különbség esetén nem átlagolható.

Megjegyzés: Hasonló formátumokat lehet használni, ha a lebomlást specifikus elemzéssel követjük, illetve a referenciaanyag és a toxicitási kontrollok esetében.

7. **ABIOTIKUS LEBOMLÁS (választható)**

	Idő (napokban)	
	0	t
DOC-koncentráció (mg/l) steril kontrollban	$C_{s(o)}$	$C_{s(o)}$

$$\% \text{ abiotikus lebomlás} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼M6

3. függelék

Az elméleti biokémiai oxigénigény kiszámítása

ZÁRT PALACK MÓDSZER

Az MW molekulatömegű $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ anyag EOI értékét a következők szerint kell kiszámítani:

$$EOI_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

Ez a számítás azt jelenti, hogy a C CO_2-vé, a H H_2O-vé, a P P_2O_5-vé és a Na Na_2O-vá mineralizálódott. A halogén hidrogén-halogenidként, a nitrogén ammóniaként eliminálódik.

Példa:

Glükóz $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$EOI = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \ \ mg\ O_2/mg\ glükóz$$

Az alkálifémektől eltérő sók molekulatömegének kiszámítása azon a feltételezésen alapul, hogy a sók hidrolizálódtak.

A kénről azt kell feltételezni, hogy +6 állapotba oxidálódik.

Példa:

Nátrium-N-dodecil-benzol-szulfonát $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$EOI = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \ \ mg\ O_2/mg\ anyag$$

A nitrogéntartalmú anyagok esetében a nitrogén a különböző elméleti biokémiai oxigénigényeknek megfelelően ammóniaként, nitritként, vagy nitrátként eliminálódhat.

$$EOI_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

$$EOI_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

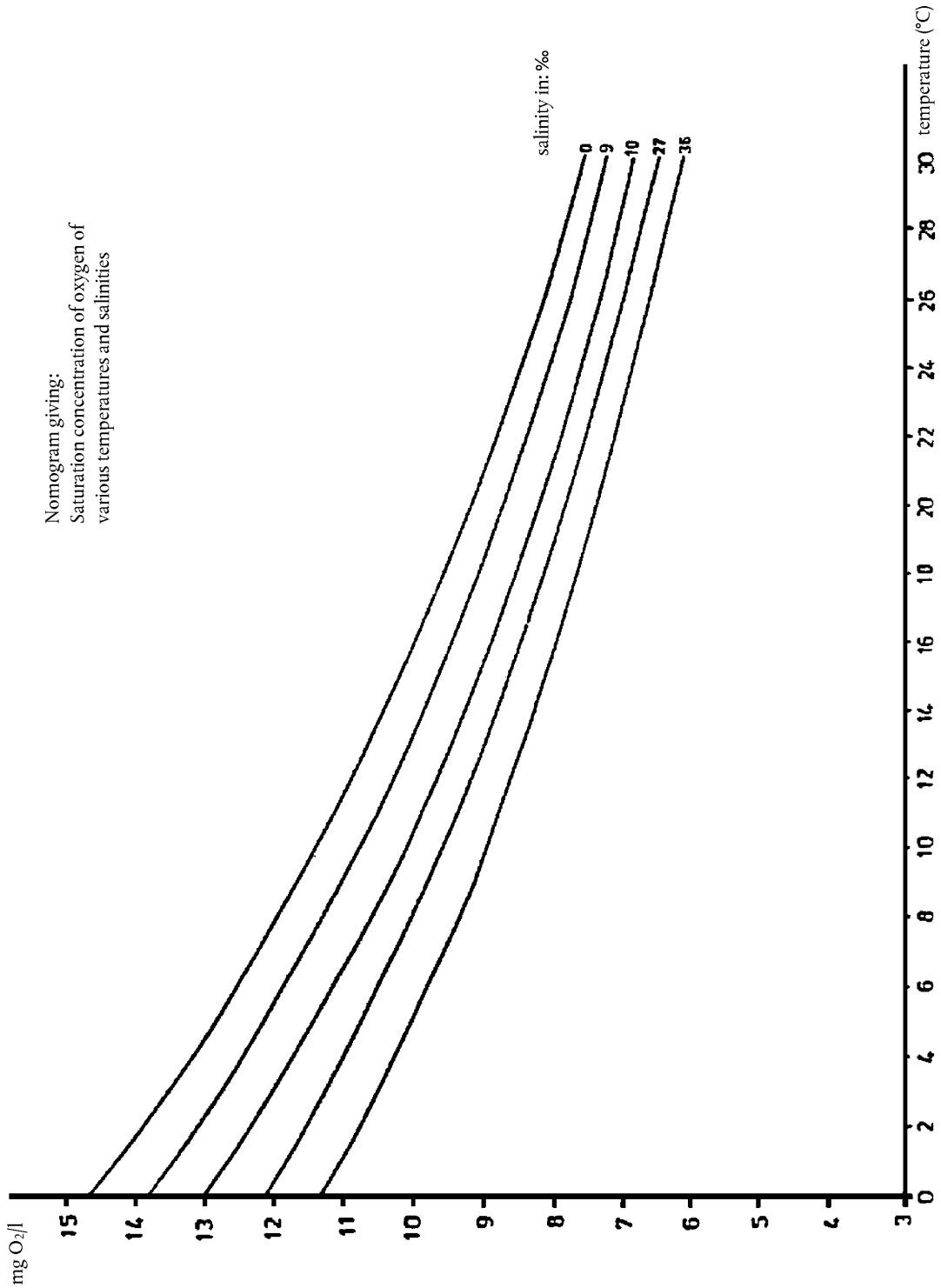
Tegyük fel, hogy teljes nitrátképződés volt megfigyelhető analízis útján egy szekunder amin esetében:

$(C_{12}H_{25})_2NH$, MW = 353

$$EOI_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \ \ mg\ O_2/mg\ anyag$$

▼**M6**

4. függelék



▼M6

5. függelék

Biológiai lebomlás tengervízben

ZÁRT PALACK MÓDSZER

ADATLAP

1. **LABORATÓRIUM:**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA:**

3. **VIZSGÁLT ANYAG:**

Név:

Törzsoldat koncentrációja:	mg/l
Kezdeti konc. tengervíz közegben:	mg/l
EOI vagy KOI:	mg O_2/mg vizsgált anyag

4. **TENGERVÍZ:**

Forrás:

Gyűjtés időpontja:

Mintavételi mélység:

Megjelenés a gyűjtés időpontjában (pl. zavaros, stb.):

Sótartalom a gyűjtéskor:	‰
Hőmérséklet a gyűjtéskor:	°C
DOC „x” órával a gyűjtés után:	mg/l

Előkezelés vizsgálat előtt (pl. szűrés, ülepítés, érlelés, stb.):

Mikrobiális telepek száma	— eredeti minta:	telep/ml
	— a vizsgálat kezdetén:	telep/ml

Egyéb jellemzők:

5. **VIZSGÁLATI KÖZEG:**

Hőmérséklet levegőztetés után:	°C
O_2 koncentráció levegőztetés után és állás a vizsgálat kezdete előtt:	mg O_2/l

6. **OLDOTT OXIGÉN (DO) MEGHATÁROZÁSA:**

Módszer: Winkler/elektróda

	Lombik száma		mg O_2/l n nap után			
			0	5	15	28
Vizsgálat: tápanyag-dúsított tengervíz vizsgált anyaggal	1	a_1				
	2	a_2				
	Vizsgálat átlaga	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼**M6**

	Lombik száma		mg O_2/l n nap után			
			0	5	15	28
Vakpróba: tápanyag – dúsított tengervíz, de vizsgált anyagot nem tartalmaz	1	c_1				
	2	c_2				
	Vakpróba átlaga	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Megjegyzés: Hasonló adatlapok használhatók a referenciaanyaghoz és a toxicitási kontrollokhoz is.

7. **DO-FOGYÁS: % LEBOMLÁS (%D):**

	DO-fogyás n nap után		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ [1]			
$\% D = \frac{(m_b - m_t)^{(1)}}{vizsgált\ anyag(mg/l) \times ThOD} \times 100$			

[1] Ez azt feltételezi, hogy $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, ahol
$m_{b(o)}$ = vak érték a 0. napon,
$m_{t(o)}$ = vizsgált anyag értéke a 0. napon.
Ha $m_{b(o)}$ nem egyenlő $m_{t(o)}$-val, használja az $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$ képletet, ahol
$m_{b(x)}$ = vak érték az x-edik napon,
$m_{t(x)}$ = vizsgált anyag értéke az x-edik napon.

▼M6

C.43. SZERVES ANYAGOK ANAEROB BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁGA ROTHASZTOTT ISZAPBAN: A GÁZTERMELÉS MÉRÉSÉN ALAPULÓ MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 311. vizsgálati iránymutatásában (2006) leírt módszerrel. Számos szűrővizsgálat létezik a szerves anyagok aerob biológiai lebonthatóságának értékelésére (C.4., C.9., C.10., C.11. vizsgálati módszer (1) és OECD 302C. vizsgálati iránymutatás (2)), és az ezek alkalmazása révén kapott eredményeket sikeresen használják a különféle anyagok sorsának előrejelzésére aerob környezetben, különösen a szennyvízkezelés aerob szakaszában. A vízben oldhatatlan, valamint a szennyvíz szilárd összetevőihez kötődő anyagok különböző arányban szintén aerob úton bomlanak le, mivel jelen vannak az ülepített szennyvízben. Ezen anyagok nagyobb frakciója azonban a primer ülepített iszaphoz kötődik, amelyet az ülepített – vagy felülúszó – szennyvíz aerob kezelése előtt az ülepítő tartályokban elválasztanak a nyers szennyvíztől. Az iszapot – amely az oldható anyagok egy részét a szemcseközi folyadékban tartalmazza – ezután a fűtött rothasztóba juttatják anaerob kezelés céljából. Mivel ez a sorozat még nem tartalmaz vizsgálati módszert az anaerob lebonthatóság értékelésére az anaerob rothasztókban, és ennek a vizsgálatnak a célja pótolni ezt a hiányosságot, a módszer nem feltétlenül alkalmazható más oxigénhiányos környezeti elemekben.

2. A keletkező gáz, elsősorban a metán (CH_4) és a szén-dioxid (CO_2) mennyiségének anaerob körülmények közötti mérésére szolgáló respirometrikus technikákat már sikerrel alkalmazták az anaerob biológiai lebonthatóság értékelésére. Birch és munkatársai (3) felülvizsgálták ezeket az eljárásokat, és arra a következtetésre jutottak, hogy Shelton és Tiedje (4) korábbi vizsgálatokon alapuló (5) (6) (7) munkája volt a legátfogóbb. A módszer (4), amelyet mások továbbfejlesztettek (8) és amerikai szabvánnyá vált (9) (10), nem oldotta meg a CO_2 és CH_4 vizsgálati közegben való eltérő oldhatóságával és a vizsgált anyag elméleti gáztermelésének kiszámításával kapcsolatos problémákat. Az ECETOC-jelentés (3) a felülúszó folyadék oldott szervetlen szén (dissolved inorganic carbon, DIC) tartalmának kiegészítő mérését ajánlotta, amely lehetővé tette a technika szélesebb körben történő alkalmazását. Az ECETOC-módszert nemzetközi kalibrációs vizsgálatnak (vagy körvizsgálatnak) vetették alá, és ISO-szabvánnyá vált (ISO 11734) (11).

3. Ez az ISO 11734 szabványon alapuló (11) vizsgálati módszer egy olyan szűrési eljárást ismertet, amely szerves anyagok potenciális anaerob biológiai lebonthatóságának értékelésére szolgál adott feltételek mellett (azaz anaerob rothasztóban, adott időpontban és a mikroorganizmusok meghatározott koncentrációtartománya mellett). Mivel olyan hígított iszapot kell használni, amelyben viszonylag magas a vizsgált anyag koncentrációja, és a vizsgálat időtartama általában meghaladja a tartózkodási időt az anaerob rothasztóban, a vizsgálati körülmények nem feltétlenül felelnek meg az anaerob rothasztóban uralkodó feltételeknek, és a módszer a szerves anyagok eltérő környezeti viszonyok közötti anaerob lebonthatóságának értékelésére sem alkalmazható. Az iszap legfeljebb 60 napig van kitéve a vizsgált anyagnak, ami hosszabb, mint az iszap normál tartózkodási ideje (25–30 nap) az anaerob rothasztókban, bár az ipari létesítményekben a tartózkodási idők sokkal hosszabbak is lehetnek. A vizsgálat eredményei alapján nem lehet olyan meggyőző előrejelzéseket tenni, mint az aerob biológiai lebonthatóság esetében, mivel a vizsgált anyagok viselkedésével kapcsolatban a „gyors” aerob vizsgálatok és a szimulációs vizsgálatok keretében, valamint az aerob környezetről gyűjtött adatok elegendőek ahhoz, hogy nagy bizonyossággal meg lehessen állapítani az összefüggést; kevés hasonló adat létezik az anaerob körülmények tekintetében. Teljes anaerob biológiai lebomlást lehet feltételezni az elméleti gáztermelés 75–80 %-ának elérése esetén. Az anyag biomasszához viszonyított magas aránya, amelyet ezekben a vizsgálatokban

▼M6

alkalmaznak, azt jelenti, hogy azok az anyagok, amelyek megfelelőnek bizonyulnak a teszten, nagyobb valószínűséggel bomlanak le egy anaerob rothasztóban. Továbbá azok az anyagok, amelyek nem alakulnak át gázzá a vizsgálatban, nem feltétlenül maradnak meg a környezetileg valósághűbb anyag-biomassza arányok mellett. Ezenkívül egyéb anaerob reakciók is fellépnek, amelyek révén az anyagok legalább részlegesen lebomolhatnak (pl. klórmentesítés), de ez a vizsgálat nem mutatja ki az ilyen reakciókat. A vizsgált anyag meghatározására szolgáló specifikus analitikai módszerekkel azonban az anyag eltűnését ellenőrizni lehet (lásd a 6., 30., 44. és 53. pontot).

A VIZSGÁLAT ELVE

4. Mosott rothasztott iszapot ([1]), amely kis koncentrációban (<10 mg/l) tartalmaz szervetlen szenet (IC), körülbelül tízszeresére hígítunk, hogy 1–3 g/l teljes szilárdanyag-koncentrációt kapjunk, és 35 ± 2 °C-on légmentesen zárt edényekben a 20–100 mg C/l tartalmú vizsgált anyaggal együtt legfeljebb 60 napig inkubáljuk. Az iszap aktivitásának mérésére párhuzamosan futó vakpróbákat állítunk be, amelyek iszap oltóanyagot tartalmaznak a közegben, de vizsgált anyagot nem.

5. Az edények fejterében uralkodó nyomás szén-dioxid és metán termeléséből származó növekedését mérjük. Az előállított CO_2 nagy része feloldódik a folyékony fázisban, illetve a vizsgálati körülmények között karbonáttá vagy hidrogén-karbonáttá alakul át. Ezt a szervetlen szenet mérjük a vizsgálat végén.

6. A vizsgált anyag biológiai lebomlásából származó szén mennyiségét (szervetlen plusz metán) a vakpróbák értékeit meghaladó nettó gáztermelésből és a folyékony fázisban bekövetkező nettó IC képződésből számítjuk ki. A biológiai lebomlás mértékét a teljes IC és metán-C előállított mennyiségéből számítjuk ki a vizsgált anyagként hozzáadott szén mért vagy számított mennyiségének százalékaként. A biológiai lebomlás menetét csak a gáztermelés köztes méréseivel lehet követni. Emellett az elsődleges biológiai lebontást a vizsgálat elején és végén végzett specifikus elemzéssel lehet meghatározni.

A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

7. Az eredmények helyes értelmezéséhez ismerni kell a vizsgált anyag tisztasági, vízoldékonysági, illékonysági és adszorpciós jellemzőit. Ismerni kell a vizsgált anyag tömegszázalékban kifejezett szerves széntartalmát, akár saját kémiai szerkezetéből, akár mérés útján. Illékony vizsgálati anyagok esetében a mért vagy számított Henry-féle állandó segít annak eldöntésében, hogy a vizsgálat alkalmazható-e vagy sem. A vizsgált anyag anaerob baktériumokkal szembeni toxicitására vonatkozó információk hasznos segítséget nyújtanak a megfelelő vizsgálati koncentráció kiválasztásában, illetve az alacsony biológiai lebomlási értékek értelmezésében. Javasolt egy gátlási kontroll bevonása, kivéve, ha ismert, hogy a vizsgált anyag nem gátolja az anaerob mikrobiális aktivitást (lásd a 21. pontot és az ISO 13641-1 szabványt (12)).

([1]) A rothasztott iszap a szennyvíz ülepített fázisaiból és eleveniszapból álló keverék, amelyeket egy anaerob rothasztóban inkubáltunk körülbelül 35 °C-on az élőanyagtömeg és a szagproblémák csökkentése, illetve az iszap víztelenítő képességének javítása érdekében. Anaerob fermentáló és metanogén baktériumok társulása, amely szén-dioxidot és metánt termel (11).

▼M6

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ALKALMAZHATÓSÁGA

8. A vizsgálati módszer vízben oldódó anyagokra alkalmazható; rosszul oldódó és oldhatatlan anyagokra is lehet alkalmazni, feltéve, hogy pontos adagolási módszert használunk, pl. lásd az ISO 10634 szabványt (13). Illékony anyagoknál általában eseti döntés szükséges. Előfordulhat, hogy speciális intézkedéseket kell tenni, például nem bocsátható ki gáz a vizsgálat alatt.

REFERENCIAANYAGOK

9. Az eljárás ellenőrzése céljából egy referenciaanyagot is vizsgálunk a normál vizsgálati futtatások részeként létrehozott megfelelő párhuzamos edényekben. A referenciaanyagok példái a fenol, a nátrium-benzoát és a polietilén-glikol 400, amelyek várhatóan 60 napon belül az elméleti gáztermelés (azaz a metán és a szervetlen szén) több mint 60 %-ában lebomlanak (3) (14).

A VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK REPRODUKÁLHATÓSÁGA

10. A nemzetközi körvizsgálatban (14) a gáznyomás mért eredményei jól reprodukálhatóak voltak a három ismétlésben beállított edények között. A relatív szórás (coefficient of variation, COV) többnyire 20 % alatt volt, bár ez az érték mérgező anyagok jelenlétében, illetve a 60 napos inkubációs időszak vége felé gyakran 20 % fölé emelkedett. Nagyobb eltéréseket is találtak a < 150 ml térfogatú edények esetében. A vizsgálati közeg végső pH-értéke a 6,5–7,0 közötti tartományban volt.

11. A körvizsgálatban a következő eredményeket kapták.

Vizsgált anyag	Összes adat n_1	Átlagos lebomlás (összes adat) (%)	Relatív szórás (összes adat) (%)	Érvényes adatok n_2	Átlagos lebomlás (érvényes adatok) (%)	Relatív szórás (érvényes adatok) (%)	> 60 % lebomlásadatok az érvényes vizsgálatokban n_3
Palmitinsav	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polietilén Glikol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Az n_2 hányada

12. A palmitinsavval és polietilén-glikol 400-zal kapott összes érték átlagának relatív szórása 45 % (n = 36), illetve 35 % (n = 38) volt. Ha a < 40 % és > 100 % értékeket kihagyták (az előbbiről feltételezve, hogy a szuboptimális körülmények okozták, az utóbbiról pedig hogy ismeretlen okok), a relatív szórások 26 %-ra és 23 %-ra csökkentek. A legalább 60 %-os lebomlást elérő „érvényes” értékek aránya 70 % volt a palmitinsav és 83 % a polietilén-glikol 400 esetében. A DIC-mérésekből származó százalékos biológiai lebomlási arányok viszonylag alacsonyak, de változók voltak. A palmitinsav esetében a tartomány 0–35 %, az átlag 12 %, a COV 92 %, a polietilénglikol 400 esetében a tartomány 0–40 %, az átlag 24 %, a COV pedig 54 % volt.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

13. A szokásos laboratóriumi berendezésekre, illetve a következő eszközökre van szükség:

a) Inkubátor – szikramentes és 35 ± 2 °C-on ellenőrzött;

▼M6

b) Nyomásálló üvegből készült, megfelelő névleges méretű ([1]) vizsgálati edények, amelyek mindegyike olyan légmentesen záró szeptummal van felszerelve, amely képes mintegy 2 bar nyomást megtartani. A fejtér térfogata a teljes térfogat körülbelül 10–30 %-a legyen. Ha a biogázt rendszeresen kiengedjük, körülbelül 10 %-os fejtéri térfogat a megfelelő, de ha a gázt csak a vizsgálat végén bocsátjuk ki, akkor 30 % a megfelelő. Ha a nyomást minden mintavételi időpontban kiengedjük, 125 ml névleges térfogatú és körülbelül 160 ml tényleges térfogatú, szérumszeptumokkal ([2]) és peremezett alumíniumgyűrűkkel lezárt üveg szérumpalackok ajánlottak;

c) Adaptált nyomásmérő eszköz ([3]), amely lehetővé teszi a termelt gáz mérését és kiengedését, például egy fecskendőtűhöz csatlakoztatott kézi precíziós nyomásmérő; háromutas légmentesen záró szelep teszi lehetővé a túlnyomás kiengedését (1. függelék). A nyomásérzékelő cső és szelep belső térfogatát a lehető legalacsonyabban kell tartani, hogy a készülék térfogatának figyelmen kívül hagyása által okozott hibák elhanyagolhatóak legyenek;

Megjegyzés — A leolvasott nyomásértékeket közvetlenül használjuk a fejtérben termelt szén mennyiségének kiszámítására (42–44. pont). Alternatív megoldásként a leolvasott nyomásértékeket egy konverziós grafikon alkalmazásával lehet átszámítani (35 °C-on, légköri nyomáson) az előállított gáz térfogatára. Ezt a grafikont olyan adatokból állítjuk össze, amelyeket ismert mennyiségű nitrogéngáz vizsgálati edények (pl. szérum palackok) sorozatába 35 ± 2 °C-on történő befecskendezésével és a kapott stabilizált nyomásértékek rögzítésével nyerünk (lásd a 2. függeléket). A számítást a 44. pont megjegyzése mutatja be.

Figyelem — Vigyázzunk, hogy elkerüljük a tűszúrást a mikrofecskendők használata során.

d) Szénanalizátor, szervetlen szén 1–200 mg/l tartományban történő közvetlen meghatározására alkalmas;

e) Nagy pontosságú fecskendők a gáz- és folyadékminták vételéhez;

f) Mágneses keverők és keverőmagok (választható);

g) Kesztyűs manipulátor (ajánlott).

Reagensek

14. Mindvégig analitikai tisztaságú reagenseket kell használni.

([1]) Az ajánlott méret 0,1–1 liter.

([2]) Légmentesen záró szilikonszeptumok használata ajánlott. Ajánlott továbbá megvizsgálni a kupakok, különösen a butilkaucsukból készült szeptumok gázbiztosságát, mert a kereskedelmi forgalomban kapható számos szeptum nem eléggé légmentes a metánnal szemben, és egyes szeptumok nem maradnak stabilan rögzülve, ha a vizsgálat körülményei között tűvel átszúrjuk.

([3]) A mérőt a gyártó utasításai szerint rendszeres időközönként használni és kalibrálni kell. Ha az előírt minőségű nyomásmérőt használjuk (pl. acél membrán tokkal), akkor nincs szükség kalibrálásra a laboratóriumban. A kalibrálás pontosságát a laboratóriumban 1×10^5 Pa nyomáson mechanikus kijelzővel ellátott nyomásmérő ellenében végzett egypontos méréssel lehet ellenőrizni. Ha ezt a pontot a készülék pontosan méri, a linearitás is változatlan lesz. Ha egyéb mérési eszközöket használunk (a gyártó által hitelesített kalibráció nélkül), a teljes tartományban rendszeres időközönként kalibrációt ajánlott végezni.

▼M6

Víz

15. Desztillált vagy ioncserélt víz (kevesebb mint 5 µl/l oxigént tartalmazó nitrogéngáz bevezetése útján oxigénmentesített), amely legfeljebb 2 mg/l oldott szerves szenet (DOC) tartalmaz.

Vizsgálati közeg

16. A oldóközeget úgy készítsük, hogy az alábbi összetevőket tartalmazza a megadott mennyiségben;

Vízmentes kálium-dihidrogén-foszfát (KH_2PO_4)	0,27 g
Dinátrium-hidrogén-foszfát-dodekahidrát ($Na_2HPO_4 \times 12H_2O$))	1,12 g
Ammónium-klorid (NH_4Cl)	0,53 g
Kalcium-klorid-dihidrát ($CaCl_2 \times 2H_2O$)	0,075g
Magnézium-klorid-hexahidrát ($MgCl_2 \times 6H_2O$)	0,10 g
Vas(II)-klorid-tetrahidrát ($FeCl_2 \times 4H_2O$)	0,02 g
Resazurin (oxigénindikátor)	0,001g
Nátrium-szulfid-nonahidrát ($Na_2S \times 9H_2O$)	0,10 g
Nyomelem-törzsoldat (választható, 18. pont)	10 ml
Adjon hozzá oxigénmentesített vizet (15)	1 literre

Megjegyzés: Frissen szállított nátrium-szulfidot kell használni, vagy az anyagot felhasználás előtt át kell mosni és meg kell szárítani, hogy biztosított legyen a megfelelő reduktív kapacitás. A vizsgálat kesztyűs manipulátor használata nélkül is elvégezhető (lásd a 26. pontot). Ebben az esetben a nátrium-szulfid végső koncentrációját a közegben 0,20 g/l $Na_2S \cdot 9H_2O$ értékre kell növelni. A nátrium-szulfidot megfelelő anaerob törzsoldatból a zárt vizsgálati edények szeptumán keresztül is hozzá lehet adni, mivel ez az eljárás csökkenti az oxidáció kockázatát. A nátrium-szulfidot titán(III)-citráttal lehet helyettesíteni, amelyet a zárt vizsgálati edények szeptumán keresztül lehet hozzáadni 0,8–1,0 mmol/l végső koncentrációban. A titán(III)-citrát egy rendkívül hatékony és alacsony toxicitású redukálószer, amelyet a következőképpen lehet előállítani: 2,94 g trinátrium-citrát-dihidrátot feloldunk 50 ml oxigénmentesített vízben (hogy 200 mmol/l-os oldatot eredményezzen), és hozzáadunk 5 ml 15 %-os (tömeg/térfogat) titán(III)-klorid oldatot. Nátrium-karbonáttal pH 7 ± 0,2 értékre semlegesítjük, és áramló nitrogéngáz alatt megfelelő edénybe adagoljuk. A titán(III)-citrát koncentrációja ebben törzsoldatban 164 mmol/l.

17. A komponenseket a redukálószer (nátrium-szulfid, titán-citrát) kivételével összekeverjük a vizsgálati közeggel, és az oldatot az oxigén eltávolítása érdekében közvetlenül a felhasználás előtt körülbelül 20 percre elárasztjuk nitrogéngázzal. Ezután – közvetlenül a közeg felhasználása előtt – hozzáadjuk a redukálószer megfelelő mennyiségű frissen (oxigénmentesített vízben) készített oldatát. Szükség esetén a közeg pH-ját híg ásványi savval vagy lúggal 7 ± 0,2 értékre állítjuk be.

▼M6

Nyomelem-törzsoldat (választható)

18. Ajánlott, hogy a vizsgálati közeg az anaerob lebomlási folyamatok javítása céljából a következő nyomelemeket tartalmazza, különösen, ha alacsony koncentrációjú (pl. 1 g/l) oltóanyagot használnak (11).

Mangán-klorid-tetrahidrát ($MnCl_2 \times 4H_2O$)	50 mg
Bórsav (H_3BO_3)	5 mg
Cink-klorid ($ZnCl_2$)	5 mg
Réz(II)-klorid ($CuCl_2$)	3 mg
Dinátrium-molibdát-dihidrát ($Na_2MoO_4 \times 2H_2O$)	1 mg
Kobalt-klorid-hexahidrát ($CoCl_2 \times 6H_2O$)	100 mg
Nikkel-klorid-hexahidrát ($NiCl_2 \times 6H_2O$)	10 mg
Dinátrium-szelenit (Na_2SeO_3)	5 mg
Adjon hozzá oxigénmentesített vizet (15)	1 literre

Vizsgált anyag

19. A vizsgált anyagot törzsoldatként, szuszpenzió vagy emulzió formájában, vagy közvetlenül szilárd vagy folyékony állapotban, vagy üvegszálas szűrőre abszorbeálva adjuk hozzá úgy, hogy a szerves szén koncentrációja legfeljebb 100 mg/l legyen. Ha törzsoldatokat használunk, olyan oldatot készítsünk (nitrogéngáz bevezetésével korábban oxigénmentesített) vízzel (15. pont), amely annyira koncentrált, hogy a hozzáadott térfogat a reakcióelegy teljes térfogatának kevesebb mint 5 %-át tegye ki. Szükség esetén a törzsoldat pH-ját 7 ± 0,2 értékre állítjuk be. Vízben rosszul oldódó vizsgált anyagok esetében az ISO 10 634 szabványhoz (13) vagy az azzal egyenértékű EU-szabványhoz kell fordulni. Amennyiben oldószert alkalmazunk, készítsünk egy további kontrollt is úgy, hogy csak az oldószert adjuk hozzá a beoltott közeghez. Kerülni kell az olyan szerves oldószereket – például a kloroformot és a szén-tetrakloridot –, amelyekről ismert, hogy gátolják a metántermelést.

Figyelmeztetés — Óvatosan bánjon a toxikus vizsgált anyagokkal, illetve azokkal, amelyek tulajdonságai nem ismertek.

Referenciaanyagok

20. A referenciaanyagokat, például a fenolt, a nátrium-benzoátot és a polietilénglikol 400-at sikeresen alkalmazták az eljárás ellenőrzésére, mivel 60 napon belül 60 %-ot meghaladó mértékben lebomlanak. A kiválasztott referenciaanyagból ugyanúgy készítünk törzsoldatot (oxigénmentesített vízben), mint a vizsgált anyag esetében, és a pH-t szükség esetén 7 ± 0,2 értékre állítjuk be.

Gátlási kontroll (feltételes)

21. Annak érdekében, hogy információkat szerezzünk a vizsgált anyag anaerob mikroorganizmusokra kifejtett toxicitásáról és beazonosítsuk a legmegfelelőbb vizsgálati koncentrációt, adjuk hozzá a vizsgált anyagot és a referenciaanyagot a vizsgálatban használttal megegyező koncentrációban (lásd a 19. és 20. pontot és lásd még az ISO 13641-1 szabványt (12)) egy vizsgálati közeget (lásd 16. pont) tartalmazó edényhez.

▼M6

Rothasztott iszap

22. A rothasztott iszapot egy olyan szennyvíztisztító telep rothasztójából kell gyűjteni, amely túlnyomórészt háztartási szennyvizet kezel. Az iszapot teljes körben jellemezni, a háttérinformációkat pedig jegyzőkönyvezni kell (lásd 54. pont). Ha adaptált oltóanyagot szándékozunk használni, meg lehet fontolni az ipari szennyvíztisztító üzemből származó rothasztott iszapot is. A rothasztott iszap gyűjtéséhez nagy sűrűségű polietilénből vagy hasonló anyagból készített, tágulásra képes, széles nyakú palackokat használjunk. A palackokat a tetejüktől körülbelül 1 cm-ig töltsük meg iszappal, majd légmentesen – lehetőleg biztonsági szeleppel – zárjuk le. A laboratóriumba való szállítás után a gyűjtött iszap közvetlenül felhasználható, vagy egy laboratóriumi méretű rothasztóban lehet elhelyezni. A felesleges biogázt az iszapos palack óvatos megnyitásával ki kell engedni. Alternatív megoldásként az oltóanyag forrásaként laboratóriumban termesztett anaerob iszapot is lehet használni, de annak aktivitási spektruma korlátozott lehet.

Figyelem – A rothasztott iszap gyúlékony gázokat termel, amelyek tűz- és robbanás veszélyt okoznak; potenciálisan kórokozó mikroorganizmusokat is tartalmaz, ezért az iszap kezeléséhez megfelelő óvintézkedéseket kell tenni. Biztonsági okokból az iszap gyűjtésére ne használjon üvegedényeket.

23. A háttér-gáztermelés, illetve a vakpróbák befolyásának csökkentése érdekében meg lehet fontolni az iszap előrothasztását. Amennyiben előrothasztásra van szükség, az iszap számára legfeljebb 7 napig 35 ± 2 °C hőmérsékletet biztosítunk, tápanyagok vagy szubsztrátumok hozzáadása nélkül. Azt találták, hogy a körülbelül 5 napig tartó előrothasztás általában a kontroll gáztermelésének optimális csökkenését eredményezi a lappangási vagy az inkubációs időszak vizsgálati fázisban mutatkozó elfogadhatatlan növekedése, illetve a kisszámú tesztelt anyag irányában mutatott aktivitás elvesztése nélkül.

24. A nehezen lebontható vagy várhatóan nehezen lebontható vizsgált anyagok esetében a jobban adaptált oltóanyag nyerése érdekében mérlegelni kell az iszap vizsgált anyaggal történő előexpozícióját. Ilyen esetben a vizsgált anyagot 5–20 mg/l szervesszén-koncentráción adjuk hozzá a rothasztott iszaphoz, és maximum 2 hétig inkubáljuk. Az előexponált iszapot használat előtt óvatosan átmossuk (lásd a 25. pontot), és a vizsgálati jegyzőkönyvben megadjuk az előexpozíció feltételeit.

Oltóanyag

25. Az iszapot az IC koncentrációjának csökkentése céljából közvetlenül használat előtt átmossuk (lásd a 22. és 24. pontot), hogy az IC koncentrációja a végső vizsgálati szuszpenzióban legfeljebb 10 mg/l legyen. Az iszapot lezárt csövekben centrifugáljuk (pl. 3 000 g, 5 perc), majd a felülúszót elöntjük. A kapott pelletet oxigénmentesített közegben szuszpendáljuk (16. és 17. pont), majd a szuszpenziót ismét centrifugáljuk és a felülúszó folyadékot újból elöntjük. Ha az IC nem csökkent megfelelő mértékben, az iszap mosási eljárását legfeljebb kétszer meg lehet ismételni. Úgy tűnik, hogy ez az eljárás nem befolyásolja hátrányosan a mikroorganizmusokat. Végül a pelletet a szükséges térfogatú vizsgálati közegben szuszpendáljuk, és meghatározzuk az összes szilárd anyag koncentrációját [pl. ISO 11923 (15)]. A szilárd anyagok végső koncentrációja a vizsgálati edényekben az 1–3 g/l tartományban legyen (avagy a hígítatlan rothasztott iszapban lévő érték körülbelül 10 %-a). A fenti műveleteket olyan módon hajtjuk végre, hogy az iszap minimális mértékben érintkezzen oxigénnel (pl. használjunk nitrogénatmoszférát).

▼M6

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

26. A következő kezdeti eljárásokat olyan technikákkal hajtjuk végre, amelyek a rothasztott iszap és az oxigén közötti érintkezést a lehetséges legalacsonyabb szinten tartják, például szükség lehet arra, hogy egy kesztyűs manipulátorban, nitrogénatmoszférában dolgozzunk és/vagy a palackokat a nitrogénnel megtisztítsuk (4).

A vizsgálatok és a kontrollok előkészítése

27. A vizsgálati edényekből legalább három ismétlést készítünk elő (lásd a 13-b. pontot) a vizsgált anyag, a vakpróbák, a referenciaanyag, a gátlási kontrollok (feltételes) és a nyomáskontroll kamrák esetében (választható eljárás) (lásd a 7., 19. és 21. pontot). További edényeket is elő lehet készíteni az elsődleges biológiai lebontásnak a vizsgált anyag specifikus elemzései segítségével történő értékelése céljából. Ugyanabban a vizsgálatban több vizsgált anyaghoz is lehet ugyanazokat a vakpróbákat használni, feltéve, hogy a fejtér térfogata konzisztens.

28. A hígított oltóanyagot az edényekhez – pl. széles szájú pipettával – történő hozzáadás előtt kell elkészíteni. A jól elkevert inokulum (25. pont) olyan alikvot mennyiségeit kell hozzáadni, hogy az összes szilárd anyag koncentrációja minden edényben azonos legyen (1 g/l és 3 g/l között). A vizsgált és a referenciaanyag törzsoldatait a pH szükség esetén 7 ± 0,2 értékre történő beállítását követően adjuk hozzá. A vizsgált anyagot és a referenciaanyagot a leginkább megfelelő beviteli útvonalon kell hozzáadni (19).

29. A szerves szén vizsgálati koncentrációja általában 20–100 mg/l között legyen (4. pont). Ha a vizsgált anyag toxikus, a vizsgálati koncentrációt 20 mg C/l-re vagy még alacsonyabb értékre kell csökkenteni, ha csak az elsődleges biológiai lebontást mérjük specifikus elemzésekkel. Meg kell jegyezni, hogy a vizsgálati eredmények szóródása alacsonyabb vizsgálati koncentrációk esetén növekszik.

30. A vak edények esetében a törzsoldat, szuszpenzió vagy emulzió helyett a vizsgált anyag bevitelére használt hordozó ekvivalens mennyiségét adjuk hozzá. Ha a vizsgált anyagot üvegszálból készült szűrők vagy szerves oldószerek használatával vittük be, a vakpróbákhoz hozzáadunk egy szűrőt vagy az elpárolgott oldószer ekvivalens térfogatát. Készíteni kell egy extra ismétlést a vizsgált anyaggal a pH érték mérésére is. Szükség esetén a pH-t kis mennyiségű híg ásványi savval vagy lúggal 7 ± 0,2 értékre állítjuk be. Azonos mennyiségű semlegesítő szert kell hozzáadni az összes vizsgálati edényhez. Ezeket a kiegészítéseket elvileg nem kellene megtenni, mivel a vizsgált anyag és a referenciaanyag törzsoldatainak pH-értékét korábban már korrigáltuk (lásd a 19. és 20. pontot). Ha a cél az elsődleges biológiai lebontás mérése, a pH-kontroll edényből vagy egy kiegészítő vizsgálati edényből kell megfelelő mintát venni, és a vizsgált anyag koncentrációját specifikus elemzésekkel kell megmérni. Mágneses keverőmagokat is hozzá lehet adni az edényekhez, ha a reakciókeverékeket majd kevergetni kell (választható).

31. Gondoskodni kell arról, hogy a folyadék teljes térfogata (V_l) és a fejtér térfogata (V_h) minden edényben azonos legyen; a V_l és V_h értékeket fel kell jegyezni és jegyzőkönyvezni kell. Az edényeket egy gázszeptummal lezárjuk, és átvisszük a kesztyűs manipulátorból (lásd a 26. pontot) az inkubátorba (lásd a 13-a pontot).

▼M6

Oldhatatlan vizsgált anyagok

32. A vízben rosszul oldódó anyagok lemért mennyiségeit közvetlenül az előkészített edényekhez kell hozzáadni. Ha oldószer használata szükséges (lásd a 19. pontot), a vizsgált anyag oldatát vagy szuszpenzióját kell az üres edényekbe átvinni. Az oldószert nitrogéngáznak az edényeken való átáramoltatásával lehetőség szerint elpárologtatjuk, majd hozzáadjuk a többi összetevőt, nevezetesen a hígított iszapot (25. pont) és az oxigénmentesített vizet. Kiegészítő oldószeres kontrollt is kell készíteni (lásd a 19. pontot). Az oldhatatlan anyagok hozzáadásának egyéb módszereivel kapcsolatban az ISO 10634 szabvány (13) ad tájékoztatást. Ha a kezdeti pH-érték várhatóan nem haladja meg a 7 ± 1 értéket, a folyékony vizsgált anyagokat fecskendővel is hozzá lehet adni a teljesen előkészített lezárt edényekhez, egyéb esetben a fentebb leírtak szerint kell eljárni (lásd a 19. pontot).

Inkubáció és a gáznyomás mérése

33. Az előkészített edényeket az egyensúlyi állapot beállása érdekében 35 ± 2 °C hőmérsékleten mintegy 1 órán át inkubáljuk, a felesleges gázt pedig kiengedjük légkörbe, például úgy, hogy az edényeket összerázzuk, a nyomásmérő tűjét (13-c. pont) a tömítésen keresztül beszúrjuk és a szelepet mindaddig nyitva tartjuk, amíg a nyomásmérő nullát nem mutat. Ha ebben a szakaszban vagy a köztes mérések alkalmával a fejtér nyomása alacsonyabbnak bizonyul a légköri nyomásnál, nitrogéngázt kell bevezetni a légköri nyomás helyreállítása céljából. A szelepet (lásd a 13-c. pontot) elzárjuk és az inkubálást sötétben folytatjuk, biztosítva, hogy az edények minden része a rothasztási hőmérsékleten legyen. Az edényeket 24–48 órás inkubáció után megvizsgáljuk. Az edényt kivesszük a további vizsgálatokból, ha az edény tartalma a felülúszó folyadékban jellegzetes rózsaszín elszíneződést mutat, azaz ha a resazurin (lásd a 16. pontot) színe megváltozott, ami oxigén jelenlétét jelzi (lásd az 50. pontot). Míg kis mennyiségű oxigént a rendszer esetleg el tud viselni, a magasabb koncentrációk nagymértékben gátolják az anaerob biológiai lebomlás menetét. A három ismétlésből alkalmanként egy-egy edény kivétele még elfogadható, de a hibák ezt meghaladó előfordulási gyakoriságának a kísérleti eljárások vizsgálatához, illetve a vizsgálat megismétléséhez kell vezetnie.

34. Az edények tartalmát legalább hetente 2–3-szor, illetve közvetlenül a nyomásmérések előtt keveréssel vagy néhány percig tartó rázással óvatosan összekeverjük. A rázás újraszuszpendálja az oltóanyagot, és biztosítja a gáznemű anyagok egyensúlyi állapotát. A nyomásméréseket gyorsan kell elvégezni, mert a vizsgálati edények hőmérséklete csökkenhet, ami téves leolvasásokhoz vezet. A nyomás mérése alatt az egész vizsgálati edényt – beleértve a fejteret is – rothasztási hőmérséklen kell tartani. A gáz nyomását például egy nyomásmérőhöz csatlakoztatott fecskendőtűnek a szeptumon keresztül történő beszúrásával (13-c. pont) mérjük. Ügyelni kell arra, hogy megakadályozzuk a víz behatolását a fecskendőtűbe; ha ez bekövetkezik, a nedves részeket ki kell szárítani, és egy új tűt kell felszerelni. A nyomást millibarban kell mérni (lásd a 42. pontot). A gáz nyomását az edényekben időszakonként (pl. hetente) lehet mérni, illetve a felesleges gázmennyiséget ki lehet bocsátani a légkörbe. Alternatív megoldásként csak a vizsgálat végén kerül sor a nyomás mérése a termelt biogáz mennyiségének megállapítása céljából.

35. Javasolt a gáznyomásról köztes leolvasásokat is végezni, mivel a nyomás növekedése útmutatást nyújt abban a tekintetben, hogy mikor lehet a vizsgálatot befejezni, illetve lehetővé teszi a kinetika nyomon követését is (lásd a 6. pontot).

▼M6

36. A vizsgálatot általában 60 nap inkubációs idő után fejezzük be, kivéve akkor, ha a nyomásmérésekből nyert biológiai lebomlási görbe korábban elérte a platót; ez az a szakasz, amelyben a maximális lebomlást már sikerült elérni, és a biológiai lebomlási görbe kiegyenlítődött. Ha a plató értéke 60 %-nál alacsonyabb, az értelmezés problematikus, mivel ez azt jelzi, hogy a molekulának csak egy része mineralizálódott, vagy hiba történt. Ha a szokásos inkubációs időszak végén gáz termelődik, de a plató fázisát nyilvánvalóan nem értük el, akkor meg kell fontolni a vizsgálat meghosszabbítását annak ellenőrzésére, hogy a plató (> 60 %) elérhető-e.

A szervetlen szén mérése

37. A vizsgálat végén – a gáznyomás utolsó mérése után – engedjük az iszapot leülepedni. Egymás után kinyitjuk mindegyik edényt, és azonnal mintát veszünk a szervetlen szén (IC) koncentrációjának (mg/l) a felülúszó folyadékban történő meghatározása céljából. A felülúszó folyadékon sem centrifugálást, sem szűrést nem szabad alkalmazni, mivel az oldott szén-dioxid elfogadhatatlan veszteségét okozná. Ha a folyadékot a mintavétel után nem lehet haladéktalanul elemezni, a mintát lezárt üvegben, fejtér nélkül, 4 °C-ra lehűtve, maximum 2 napig tároljuk. Az IC mérése után megmérjük és feljegyezzük a pH értékét is.

38. Alternatív megoldásként az IC-t a felülúszóban közvetett módon, az oldott IC szén-dioxidként történő felszabadulása alapján is meg lehet határozni, amely a fejtérben mérhető. A gáznyomás utolsó mérése után a vizsgálati edények nyomását légköri nyomásra állítjuk be. Az edények tartalmát körülbelül pH 1-re savasítjuk tömény ásványi savnak (pl. H_2SO_4) a lezárt edények szeptumán keresztüli hozzáadásával. Az összerázott edényeket 35 ± 2 °C-on körülbelül 24 órán át inkubáljuk, és a képződött szén-dioxidból származó gáznyomást nyomásmérő segítségével megmérjük.

39. Hasonló méréseket kell végezni a megfelelő vakpróbákon, referenciaanyagon és – ha van – a gátlási kontroll edényeken is (lásd a 21. pontot).

40. Egyes esetekben – különösen, ha ugyanazonokat a kontroll edényeket használjuk több vizsgált anyaghoz is – mérlegelni kell, hogy köztes IC-koncentráció-méréseket is végezzünk a vizsgált és a kontrolledényekben. Ebben az esetben elegendő számú edényt kell előkészíteni az összes köztes méréshez. Ezt az eljárást kell előnyben részesíteni azzal a módszerrel szemben, amikor minden mintát egyetlen edényből veszünk. Az utóbbi csak akkor valósítható meg, ha a DIC-elemzéshez szükséges mennyiség nem tekinthető túl magasnak. A DIC-mérést a gáznyomás – felesleges gáz kiengedése nélkül elvégezett – mérése után kell végrehajtani az alábbiakban leírtak szerint:

— a lehető legkisebb térfogatú felülúszó-mintákat kell venni az edények megnyitása nélkül, a szeptumon keresztül beszúrt fecskendővel, és a mintákban meg kell határozni az IC-t;

— a mintavétel után a felesleges gázt kiengedjük, vagy nem;

— figyelembe kell venni, hogy a felülúszó térfogatának akár kismértékű csökkenése is (pl. körülbelül 1 %) a fejtér gáztérfogatának (V_h) jelentős növekedését eredményezheti;

— szükség szerint az egyenleteket (lásd a 44. pontot) a V_h 3. egyenletben történő megnövelésével korrigáljuk.

▼M6

Specifikus elemzések

41. Ha az elsődleges anaerob lebontást (lásd a 30. pontot) kell meghatározni, a specifikus elemzések céljára a vizsgálat elején és végén veszünk megfelelő mennyiségű mintát a vizsgált anyagot tartalmazó edényekből. Ha ez megtörtént, fel kell jegyezni, hogy a fejtér (V_h) és a folyadék (V_l) térfogata megváltozott, és ezt figyelembe kell venni a gázképződés eredményeinek kiszámításakor. Alternatív megoldásként a korábban erre a célra felállított további keverékekből is lehet mintát venni a specifikus elemzések céljára (30).

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

42. Gyakorlati okokból a gáz nyomását millibarban (1 mbar = 1h Pa = 10^2 Pa; 1 Pa = 1 N/m^2), a térfogatot literben, a hőmérsékletet pedig Celsius-fokban mérjük.

Szén a fejtérben

43. Mivel 1 mol metán és 1 mol szén-dioxid egyaránt 12 g szenet tartalmaz, a szén tömege adott térfogatú képződő gázban a következőképpen fejezhető ki:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{[1] egyenlet}$$

ahol:

m = a szén tömege (mg) adott térfogatú képződő gázban;

12 = a szén relatív atomtömege;

n = a gáz móljainak száma az adott térfogatban.

Ha jelentős mennyiségű, a metántól és a szén-dioxidtól elérő gáz (pl. N_2O) keletkezik, az [1] egyenletet módosítani kell, hogy alkalmas legyen a képződő gázok lehetséges hatásainak leírására.

44. A gáztörvényekből n a következőképpen fejezhető ki:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{[2] egyenlet}$$

ahol:

p = a gáz nyomása (Pa);

V = a gáz térfogata (m^3);

R = az egyetemes gázállandó: 8,314 J/(mol K);

T = az inkubációs hőmérséklet (kelvin).

Az [1] és a [2] egyenlet kombinációjával, illetve a vakpróba gáztermelésének figyelembevételét célzó ésszerűsítéssel:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{[3] egyenlet}$$

ahol:

m_h = a fejtérben gázként termelődött nettó szén tömege (mg);

Dp = a vizsgálati edények kezdeti és végső nyomásértékei közötti különbség átlaga mínusz a vak edények megfelelő átlaga (millibar);

▼M6

V_h = az edény fejterének térfogata (l);

0,1 = a newton/m^2-t millibarra és a m^3-t literre átváltó szorzó.

35 °C (308 K) normál inkubációs hőmérséklet esetén a [4] egyenletet kell alkalmazni:

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \qquad \text{[4] egyenlet}$$

Megjegyzés: Alternatív térfogatszámítás. A nyomásmérő leolvasott értékeit a képződő gáz egységnyi ml-jére konvertáljuk egy olyan standard görbe alkalmazásával, amelyet a befecskendezett térfogatnak (ml) a mérő által mutatott érték függvényében történő ábrázolásával kaptunk (2. függelék). Az edények fejrészében lévő gáz móljainak számát (n) úgy számítjuk ki, hogy az összesített gáztermelést (ml) elosztjuk 25 286 ml/mol-lal, amely az egy mól gáz által 35 °C-on és normál légköri nyomáson elfoglalt térfogat. Mivel 1 mól CH_4 és 1 mól CO_2 egyaránt 12 g szenet tartalmaz, a szén mennyiségét (m, mg) a fejtérben (m_h) az [5] egyenlet adja meg:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \qquad \text{[5] egyenlet}$$

A vakpróba gáztermelésének figyelembevételét célzó ésszerűsítés után:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0{,}475\Delta V \qquad \text{[6] egyenlet}$$

ahol:

m_h = a fejtérben gázként képződött nettó szén tömege (mg);

DV = a vizsgálati edények és a vakpróbaedények fejterében képződött gázmennyiség térfogatkülönbségének átlaga;

25286 = 1 mol gáz által elfoglalt térfogat 35 °C-on, 1 atmoszféra nyomáson.

45. A biológiai lebomlás menetét szükség esetén a Dp kumulált nyomásemelkedés (millibar) idő függvényében történő ábrázolásával lehet nyomon követni. E görbéből azonosítjuk és feljegyezzük a lappangási fázist (nap). A lappangási fázis a vizsgálat kezdetétől a jelentős bomlás kezdetéig tartó időszak (például lásd a 3. függeléket). Amennyiben a felülúszóból köztes mintákat vettünk és elemeztük azokat (lásd a 40., 46. és 47. pontot), a kumulált nyomásemelkedés helyett a teljes megtermelt C mennyiségét (gáz plusz a folyadékban lévő) lehet ábrázolni.

Szén a folyadékban

46. A folyadékban lévő metán mennyiségét elhanyagoljuk, mert ismeretes, hogy a metán vízben való oldhatósága nagyon alacsony. A vizsgálati edényekben lévő folyadékban található szervetlen szén tömegének kiszámításához a [7] egyenlet használható:

$$m_l = C_{net} \times V_l \qquad \text{[7] egyenlet}$$

ahol:

m_l = a szervetlen szén tömege a folyadékban (mg);

C_{net} = a szervetlen szén koncentrációja a vizsgálati edényekben mínusz a kontrolledényekben a vizsgálat végén (mg/l);

V_l = a folyadék térfogata az edényben (l).

▼M6

Összes gázzá alakított szén

47. A gázzá alakított szén teljes tömegét az edényben a [8] egyenlet használatával kell kiszámítani:

$$m_t = m_h + m_l \qquad \text{[8] egyenlet}$$

ahol:

m_t = a gázzá alakított szén teljes tömege (mg);

m_h és m_l a fentiek szerint meghatározott mennyiségek.

A vizsgált anyag széntartalma

48. A hozzáadott vizsgált anyagból származó szén tömegét a vizsgálati edényekben a [9] egyenlet felhasználásával számítjuk ki:

$$m_v = C_c \times V_l \qquad \text{[9] egyenlet}$$

ahol:

m_v = a vizsgált anyag széntartalmának tömege (mg);

Cc = a vizsgált anyagból származó szén koncentrációja a vizsgálati edényben (mg/l);

V_l = a folyadék térfogata a vizsgálati edényben (l).

A biológiai lebomlás mértéke

49. A fejtérben lévő gázból történő százalékos biológiai lebomlást a [10] egyenlet, a teljes százalékos biológiai lebomlást a [11] egyenlet alkalmazásával számítjuk ki:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \qquad \text{[10] egyenlet}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \qquad \text{[11] egyenlet}$$

ahol:

D_h = a biológiai lebomlás a fejtérben lévő gázból (%);

D_t = a teljes biológiai lebomlás (%);

m_h, m_v és m_t a fentiek szerint meghatározott mennyiségek.

Az elsődleges biológiai lebontás mértékét a vizsgált anyag koncentrációjának az inkubálás elején és végén történő (választható) méréséből számítjuk ki a [12] egyenlet alkalmazásával:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \qquad \text{[12] egyenlet}$$

ahol:

D_p = a vizsgált anyag elsődleges lebomlása (%);

S_i = a vizsgált anyag kezdeti koncentrációja (mg/l);

S_e = a vizsgált anyag végső koncentrációja (mg/l).

Ha az analitikai módszer a vizsgált anyag jelentős koncentrációját jelzi a nem módosított anaerob iszap oltóanyagban, a [13] egyenletet kell használni:

▼M6

$$D_p^{\,1} = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \qquad [13] \text{ egyenlet}$$

ahol:

$D_p^{\,1}$ = a vizsgált anyag korrigált elsődleges lebomlása (%);

S_{ib} = a vizsgált anyag kezdeti „látszólagos” koncentrációja a vakpróbákban (mg/l);

S_{eb} = a vizsgált anyag végső „látszólagos” koncentrációja a vakpróbákban (mg/l).

Az eredmények érvényessége

50. Csak az olyan edényekből származó leolvasott nyomásértékeket szabad felhasználni, amelyek nem mutatnak rózsaszín elszíneződést (lásd a 33. pontot). Az oxigénszennyeződés megfelelő anaerob kezelési technikák használatával minimalizálható.

51. A vizsgálat akkor tekinthető érvényesnek, ha a referenciaanyag elér egy legalább 60 %-os biológiai lebomlásnak megfelelő platót. ([1])

52. Ha a pH a vizsgálat végén túllépte a 7 ± 1 tartományt és elégtelen biológiai lebomlás következett be, a vizsgálatot a közeg megnövelt pufferkapacitásával meg kell ismételni.

A lebomlás gátlása

53. A vizsgált anyagot és a referenciaanyagot egyaránt tartalmazó edényekben a gáztermelésnek legalább ugyanakkorának kell lennie, mint a csak referenciaanyagot tartalmazó edényekben; az ettől eltérő eseteket a gáztermelés gátlásának kell tekinteni. Egyes esetekben a vizsgált anyagot a referenciaanyag nélkül tartalmazó edényekben a gáztermelés alacsonyabb lesz, mint a vakpróbákban, ami a vizsgált anyag gátló hatását jelzi.

Vizsgálati jegyzőkönyv

54. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

— közönséges név, kémiai név, CAS-szám, szerkezeti képlet és a releváns fizikai és kémiai tulajdonságok;

— a vizsgált anyag tisztasága (szennyeződései).

Vizsgálati feltételek:

— a hígított rothasztó folyadék térfogata (V_l) és a fejtér térfogata (V_h) az edényben;

— a vizsgálati edények leírása, a biogázmérés (pl. a nyomásmérő típusa) és az IC-analizátor fő jellemzői;

— a vizsgált anyag és referenciaanyag bevitele a vizsgálati rendszerbe: az alkalmazott vizsgálati koncentrációk és az oldószerek használata;

— az alkalmazott oltóanyag részletes jellemzése: a szennyvíztisztító telep neve, a kezelt szennyvíz forrásának leírása (pl. működési hőmérséklet, iszaptartózkodási idő, túlnyomórészt háztartási stb.), koncentráció, minden ennek alátámasztásához szükséges információ, és az inokulum előkezelésére vonatkozó információk (pl. előemésztés, előexpozíció);

— inkubálási hőmérséklet,

— ismétlések száma.

([1]) Ezt újra kell értékelni, ha adszorpciós és oldhatatlan referencia-vegyianyagokat használunk.

▼**M6**

Eredmények:

— pH- és IC-értékek a vizsgálat végén;

— a vizsgált anyag koncentrációja a vizsgálat elején és végén, ha specifikus mérések történtek;

— a vizsgálati, vakpróba-, referenciaanyag- és gátlásikontroll-edényekben gyűjtött összes mért adat megfelelő módon (pl. nyomás millibarban, szervetlen szén koncentráció (mg/l)), táblázatos formában (a fejtér és a folyadék vonatkozásában mért adatokat külön kell megadni);

— az adatok statisztikai kezelése, a vizsgálat időtartama, valamint a vizsgált anyag, a referenciaanyag és a gátlási kontroll biológiai lebomlásának grafikonja;

— a vizsgált anyag és a referenciaanyag százalékos biológiai lebomlása;

— a vizsgálati eredmények esetleges elvetésének oka;

— az eredmények szöveges elemzése.

SZAKIRODALOM

(1) E melléklet következő fejezetei:

C.4., A „gyors” biológiai lebonthatóság meghatározása;

C.9, Biológiai lebomlás – Zahn-Wellens vizsgálat;

C.10, Szimulációs vizsgálat – Aerob szennyvízkezelés:

A: Eleveniszapos berendezések, B: Biofilmek

C.11, Biológiai lebomlás – Eleveniszap légzésgátló hatásának vizsgálata

(2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris

(3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga,U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550. (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988).

(4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Toxic. Appl. Environ. Mircobiology, 47, 850-857.

(5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485-492.

(6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. 38, 84-89.

(7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.

(8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. Chemosphere, 17, 2441-2460.

(9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.

▼**M6**

(10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

(11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality – Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge – Method by measurement of the biogas production.

(12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1 General Test.

(13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

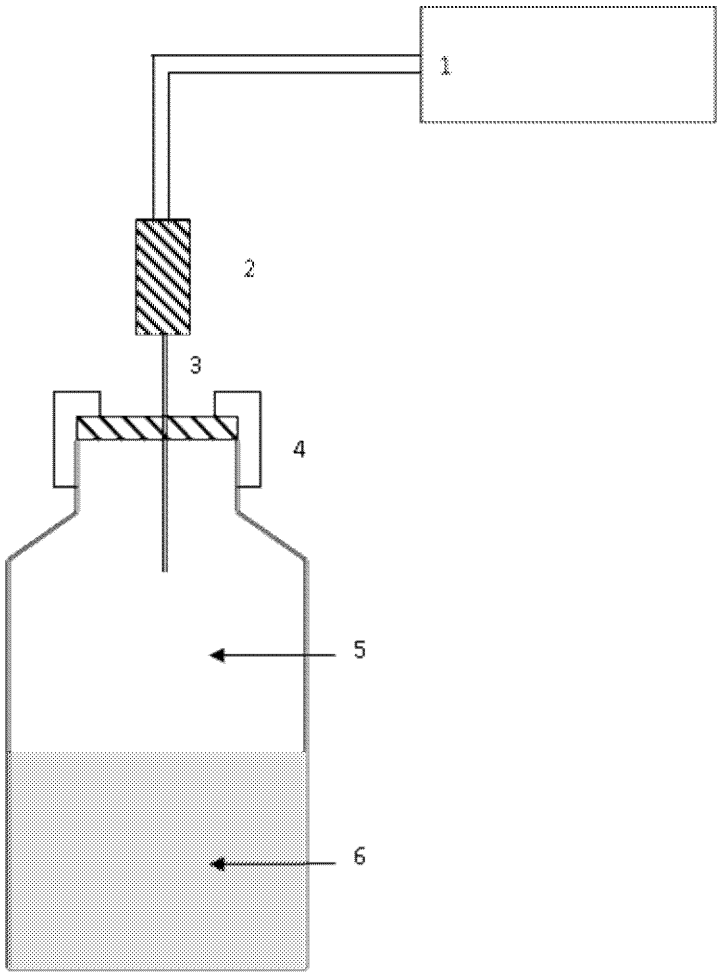
(14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499-1509.

(15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

1. függelék

Példa a biogáztermelést gáznyomás útján mérő készülékre



Jelmagyarázat:

1 – Nyomásmérő

2 – Háromutas légmentesen záró szelep

3 – Injekciós tű

4 – Légmentesen záró tömítés (peremezett sapka és szeptum)

5 – Fejtér (V_h)

6 – Rothasztott iszap oltóanyag

Vizsgálati edények 35 ± 2 °C-os környezetben

▼M6

2. függelék

A mért nyomásértékek konverziója

A nyomásmérőn leolvasott értékeket a gázmennyiségekkel egy standard görbe segítségével lehet kapcsolatba hozni, amelyet ismert térfogatú 35 ± 2 °C hőmérsékletű levegőnek a reakcióeleggyel (V_R) megegyező térfogatú vizet tartalmazó szérumpalackokba történő befecskendezésével lehet előállítani:

— V_R ml alikvot mennyiségű vizet töltünk öt db 35 ± 2 °C hőmérsékleten tartott szérumpalackba. A palackokat lezárjuk és 1 órára 35 ± 2 °C hőmérsékletű vízfürdőbe helyezzük, hogy egyensúlyi állapotba kerüljenek;

— Bekapcsoljuk a nyomásmérőt és megvárjuk, amíg stabilizálódik, majd nullára állítjuk;

— A fecskendőtűt átszúrjuk az egyik palack tömítésén, kinyitjuk a szelepet, amíg a nyomásmérő nullát nem mutat, majd újra elzárjuk a szelepet;

— Az eljárást megismételjük a többi palackkal is;

— Minden palackba 1 ml 35 ± 2 °C hőmérsékletű levegőt injektálunk. A tűt (a mérőre csatlakoztatva) átszúrjuk az egyik palack tömítésén, és megvárjuk, amíg a nyomás stabilizálódik. Feljegyezzük a nyomást, és kinyitjuk a szelepet, amíg a nyomás nullát nem mutat, majd újra elzájuki a szelepet;

— Az eljárást megismételjük a többi palackkal is;

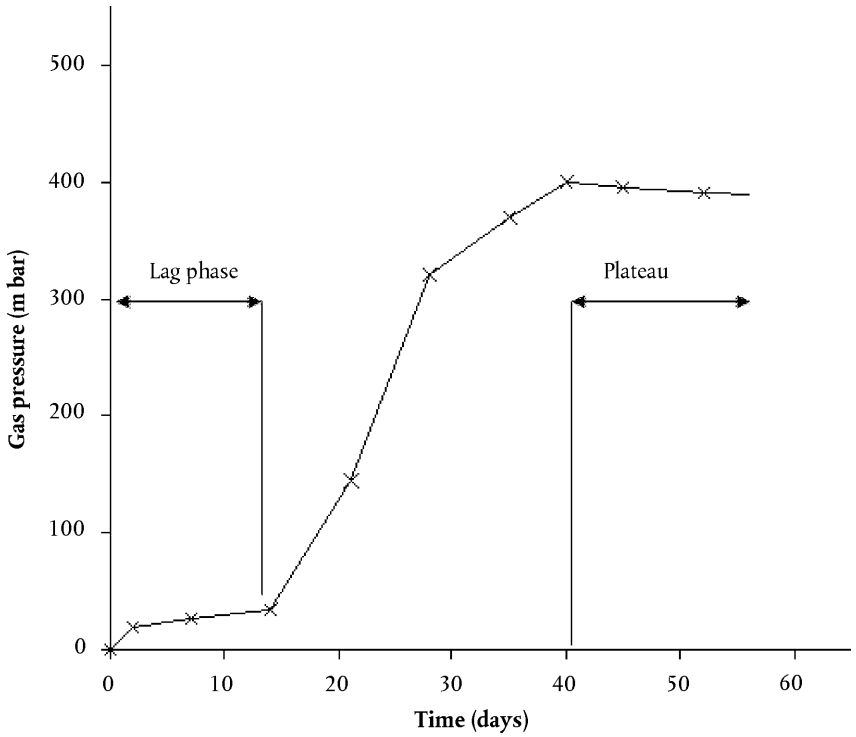
— A teljes fenti eljárást megismételjük 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml, és 50 ml levegővel is;

— Felvesszük a nyomás (Pa) konverziós görbéjét a beadott gázmennyiség (V_b, ml) függvényében. Az eszköz válasza lineáris a 0–70 000 Pa és a 0–50 ml gáztermelés tartományban.

▼**M6**

3. függelék

Példa a lebomlási görbére (kumulált nettó nyomásnövekedés)



▼M6

4. függelék

Példa az anaerob biológiai lebomlási vizsgálat adatlapjaira – A vizsgált anyag adatlapja

Laboratórium: ..... Vizsgált anyag: ..... Vizsgálat száma: .....

Vizsgálati hőmérséklet (°C): ..... Fejtér térfogata (V_h): .....(l) Folyadék térfogata (V_l): .....(l)

Szén a vizsgált anyagban $C_{c,v}$: .....(mg/l) m_v [1]: .....(mg)

Nap	p_1 (vizsgálat) (mbar)	p_2 (vizsgálat) (mbar)	p_3 (vizsgálat) (mbar)	p (vizsgálat) átlag (mbar)	p_4 (vakpróba) (mbar)	p_5 (vakpróba) (mbar)	p_6 (vakpróba) (mbar)	p (vakpróba) átlag (mbar)	p (nettó) vizsgálat – vakpróba átlag (mbar)	Δp (nettó) Kumulált érték (mbar)	m_h fejtér C [2] (mg)	D_h Biológiai lebomlás [3] (%)
	$C_{IC,\ 1}$ vizsgálat (mg)	$C_{IC,\ 2}$ vizsgálat (mg)	$C_{IC,\ 3}$ vizsgálat (mg)	C_{IC} vizsgálat átlaga (mg)	$C_{IC,\ 4}$ vakpróba (mg)	$C_{IC,\ 5}$ vakpróba (mg)	$C_{IC,\ 6}$ vakpróba (mg)	C_{IC} vakpróba átlaga (mg)	$C_{IC,\ net}$ vizsgálat – vakpróba átlag (mg)	m_l folyadék C [4] (mg)	m_t összes C [5] (mg)	D_t Biológiai lebomlás [6] (%)
IC (végső)												
pH (végső)												

(1) Szén a vizsgálati edényben, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

(2) Szén a fejtérben, m_h (mg) normál inkubációs hőmérsékleten (35 °C): $m_h = 0{,}468\Delta p \times V_h$

(3) Biológiai lebomlás a fejtérben lévő gáz alapján meghatározva, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

(4) Szén a folyadékban, ml (mg): $ml = CIC,net \times Vl$

(5) Összes gázzá alakított szén, mt (mg): $mt + ml$

(6) Teljes biológiai lebomlás, Dt (%): $Dt = (mt \times 100) / mv$

▼M6

Laboratórium: ..... Referenciaanyag: ..... Vizsgálat száma: .....

Vizsgálati hőmérséklet (°C): ..... Fejtér térfogata (V_h): .....(l) Folyadék térfogata (V_l) .....(liter):

Szén a referncianyagban $C_{c,v}$ .....(mg/l): m_v ([1]) (mg):

Nap	p_1 (referencia) (mbar)	p_2 (referencia) (mbar)	p_3 (referencia) (mbar)	p (referencia) átlag (mbar)	p_4 (gátlás) (mbar)	p_5 (gátlás) (mbar)	p_6 (gátlás) (mbar)	p (gátlás) átlag (mbar)	p (referencia) referencia – vakpróba (mbar)	Δp (referencia) kumulált (mbar)	m_h fejtér C ([2]) (mg)	D_h Biológiai lebomlás ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ referencia (mg)	$C_{IC,\ 2}$ referencia (mg)	$C_{IC,\ 3}$ referencia (mg)	C_{IC} referencia átlaga (mg)	$C_{IC,\ 4}$ gátlás (mg)	$C_{IC,\ 5}$ gátlás (mg)	$C_{IC,\ 6}$ gátlás (mg)	C_{IC} gátlás átlaga (mg)	$C_{IC,\ net}$ referencia – gátlás (mg)	m_l folyadék C ([4]) (mg)	m_t összes C ([5]) (mg)	D_t Biológiai lebomlás ([6]) (%)
IC (végső)												
pH (végső)												

([1]) Szén a vizsgálati edényben, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

([2]) Szén a fejtérben, m_h (mg) normál inkubációs hőmérsékleten (35 °C): $m_h = 0{,}468\Delta p \times V_h$

([3]) Biológiai lebomlás a fejtérben lévő gáz alapján meghatározva, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

([4]) Szén a folyadékban, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net}V_l$

([5]) Összes gázzá alakított szén, m_t (mg): $m_t + m_l$

([6]) Teljes biológiai lebomlás, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

▼M6

C.44. KIMOSÓDÁS TALAJOSZLOPOKBAN

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 312. vizsgálati iránymutatásában (2004) leírt módszerrel. A mesterséges vegyi anyagok közvetlenül, szándékos alkalmazás révén (pl. mezőgazdasági vegyszerek), vagy közvetett útvonalakon (pl. szennyvíz → szennyvíziszap → talaj vagy levegő → nedves/száraz ülepedés) kerülhetnek be a talajba. E vegyi anyagok kockázatértékeléséhez fontos megbecsülni a talajban való átalakulásra, illetve a mélyebb talajrétegek és végül a talajvíz irányába történő mozgásra (kimosódás) vonatkozó potenciáljukat.

2. Számos módszer áll rendelkezésre a vegyi anyagok talajbeli kimosódási potenciáljának ellenőrzött laboratóriumi körülmények között történő mérésére, pl. a talaj vékonyréteg-kromatográfia, a talaj vastagréteg-kromatográfia, a talaj-oszlopkromatográfia, és az adszorpciós-deszorpciós mérések (1) (2). A nem ionizált vegyi anyagok esetében az n-oktanol-víz megoszlási hányados (P_{ow}) lehetővé teszi az adszorpciós és a kimosódási potenciál korai becslését (3) (4) (5).

3. A jelen vizsgálati módszerben leírt eljárás bolygatott talajban végzett talaj-oszlopkromatográfián alapul (a fogalom meghatározását lásd az 1. függelékben). Kétféle kísérletet hajtunk végre: (i) a vizsgált vegyi anyag kimosódási potenciáljának és (ii) az átalakulási termékek kimosódási potenciáljának (érlelt maradványokkal végzett vizsgálat) talajokban, ellenőrzött laboratóriumi körülmények között történő meghatározása ([1]). A vizsgálati módszer meglévő módszereken alapul (6) (7) (8) (9) (10) (11).

4. A talajok/üledékek kiválasztásával foglalkozó OECD Workshopon (Belgirate, Olaszország, 1995.) (12) megállapodás született az e vizsgálati módszerben használandó talajok számát és típusát illetően. Ajánlásokat tettek a talajminták kimosódási kísérletek céljából történő gyűjtése, kezelése és tárolása tekintetében is.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

5. Megfelelően inert anyagból (pl. üveg, rozsdamentes acél, alumínium, teflon, PVC stb.) készült oszlopokat megtöltünk talajjal, majd „mesterséges eső” oldattal (a fogalmak meghatározását lásd az 1. függelékben) telítjük és egyensúlyba hozzuk, ezt követően pedig hagyjuk az oldatot kicsorogni belőle. Ezután a talajoszlopok felületét a vizsgált vegyi anyaggal és/vagy a vizsgált vegyi anyag érlelt maradványaival kezeljük. A talajoszlopokat ezután mesterséges esőnek tesszük ki, és összegyűjtjük a csurgalékvizet. A kimosódási folyamat után az oszlopokból eltávolítjuk a talajt, és – a vizsgálattól elvárt információktól függő – megfelelő számú szegmensre osztjuk. A talajszegmenseket és a csurgalékvizet ezután analizáljuk a vizsgált vegyi anyagra, illetve – adott esetben – az átalakulási termékekre vagy az érdeklődésre számot tartó egyéb vegyi anyagokra.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ALKALMAZHATÓSÁGA

6. A módszer olyan (nem jelölt vagy radioaktív izotóppal – pl. ^{14}C-vel – jelölt) vizsgált vegyi anyagokra alkalmazható, amelyek kimutatására megfelelő pontosságú és érzékenységű analitikai módszer áll rendelkezésre. A vizsgálati módszer nem alkalmazható olyan vegyi anyagok esetében, amelyek talajból és vízből illékonyak, és így a vizsgálati eljárás kísérleti körülményei között nem maradnak meg a talajban és/vagy a csurgalékvízben.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

7. A kimosódás talajoszlopokban történő mérésére nem jelölt vagy radioaktív izotóppal jelölt vizsgált vegyi anyagokat lehet használni. Radioaktív izotóppal jelölt anyagra van szükség az átalakulási termékek (a vizsgált

([1]) A növényvédelmi termékekkel végzett oszlopkimosódási vizsgálatok mobilitási információt nyújthatnak a vizsgált vegyi anyagról és átalakulási termékeiről, illetve kiegészíthetik a tétel szorpciós vizsgálatokat.

▼M6

vegyi anyag érlelt maradványai) kimosódásának vizsgálatához és a tömegegyensúly meghatározásához. A ^{14}C-vel való jelölés ajánlott, de egyéb izotópok, például a ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P is hasznosak lehetnek. Amennyire csak lehet, a jelölést a molekula legstabilabb részében vagy részeiben kell elhelyezni. A vizsgált vegyi anyag tisztasága legalább 95 % legyen.

8. A legtöbb vegyi anyagot önálló anyagként kell alkalmazni. A növényvédő szerek hatóanyagai esetében azonban a formulázott termékeket is használni lehet a kiindulási vizsgált anyag kimosódásának vizsgálatára, és a formulázott termékek vizsgálata különösen fontos akkor, ha a keverék valószínűleg befolyásolja a kibocsátás mértékét (pl. szemcsés vagy szabályozott hatóanyag-leadású készítmények). A vizsgálat elvégzése előtt hasznos lehet konzultálni a szabályozó hatósággal a keverékek vizsgálati tervet érintő különleges követelményei tekintetében. Az érlelt maradványok kimosódási vizsgálatai esetében tiszta kiindulási vizsgált anyagot kell használni.

9. A kimosódási vizsgálat talajoszlopban történő elvégzését megelőzően a következő információknak kell rendelkezésre állnia a vizsgált vegyi anyagra vonatkozóan:

(1) vízben való oldhatóság [A.6. vizsgálati módszer] (13);

(2) szerves oldószerekben való oldhatóság;

(3) gőznyomás [A.4. vizsgálati módszer] (13) és Henry-féle állandó;

(4) n-oktanol/víz megoszlási hányados [A.8. és A.24. vizsgálati módszer] (13);

(5) adszorpciós együttható (K_d, K_f vagy K_{OC}) [C.18. és/vagy C.19. vizsgálati módszer] (13);

(6) hidrolízis [C.7. vizsgálati módszer] (13);

(7) disszociációs állandó (pK_a) [OECD 112. vizsgálati iránymutatás] (25);

(8) aerob és anaerob átalakulás talajban [C23. vizsgálati módszer] (13)

Megjegyzések: A hőmérsékletet, amelynél ezeket a méréseket végeztük, fel kell tüntetni az adott vizsgálati jegyzőkönyvben.

10. A talajoszlopokon alkalmazott vizsgált vegyi anyag mennyiségének elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye az alkalmazott dózis legalább 0,5 %-ának kimutatását bármely szegmensben. A növényvédő szerekben lévő hatóanyagok esetében az alkalmazott vizsgált vegyi anyag mennyisége megfelelhet a maximális ajánlott használati aránynak (egyszeri alkalmazás).

11. Rendelkezésre kell állnia olyan analitikai módszernek, amely ismert pontossággal, precizitással és érzékenységgel bír a vizsgált vegyi anyag és – szükség esetén – átalakulási termékei talajban és csurgalékvízben történő mennyiségi meghatározására. Szintén ismerni kell a vizsgált vegyi anyag és jelentős átalakulási termékei (általában legalább az összes olyan átalakulási termék, amelyekből a vegyi anyag alkalmazott adagja $\geq$ 10 %-ának megfelelő mennyiséget figyeltek meg az átalakulási útvonalakat elemző vizsgálatokban, de lehetőleg minden aggodalomra okot adó lényeges átalakulási termék) analitikai kimutathatósági határát (lásd a 17. pontot).

▼M6

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

12. Ismert kimosódási viselkedésű referencia-vegyianyagokat – mint az atrazin vagy monuron, amelyek a terepen közepesen kimosódónak tekinthetők – kell alkalmazni a vizsgált vegyi anyag talajban mutatott relatív mobilitásának értékelésére (1) (8) (11). Egy nem szorbeálódó és nem lebomló poláris referencia-vegyianyag (pl. trícium, bromid, fluoreszcein, eozin) alkalmazása is hasznos lehet a víz oszlopban való mozgásának nyomon követésére, amellyel igazolni lehet a talajoszlop hidrodinamikai tulajdonságait.

13. Az analitikai szabvány vegyi anyagok is hasznosak lehetnek a talajszegmensekben és a csurgalékvízben talált transzformációs termékek jellemzésére és/vagy azonosítására kromatográfiás, spektroszkópiai vagy más vonatkozó módszerekkel.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

14. Lásd a 1. függeléket.

MINŐSÉGI KRITÉRIUMOK

Visszanyerés

15. A kimosódási vizsgálatban a visszanyerést a kimosódást követően a vizsgált vegyi anyagnak a talajszegmensekben és az oszlop csurgalékvízben talált százalékainak összege adja meg. A visszsnyerésnek a 90–110 % tartományban kell lennie a radioaktív izotóppal jelölt vegyi anyagok (11), illetve 70–110 % között a nem jelölt vegyi anyagok esetében (8).

Az analitikai módszer ismételhetősége és érzékenysége

16. A vizsgált vegyi anyag és átalakulási termékeinek mennyiségi meghatározására használt analitikai módszer ismételhetőségét a talajszegmens vagy csurgalékvíz ugyanazon kivonatának párhuzamos elemzésével lehet ellenőrizni (lásd a 11. pontot).

17. A vizsgált vegyi anyag és az átalakulási termékek analitikai módszerének kimutatási határértéke (limit of detection, LOD) legalább 0,01· mg/kg legyen minden talajszegmensben vagy csurgalékvízben (a vizsgált vegyi anyagra vonatkoztatva), illetve az alkalmazott dózis 0,5 %-a bármely szegmensben (amelyik az alacsonyabb). A mérhetőségi határértéket (limit of quantification, LOQ) is meg kell határozni.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Vizsgálati rendszer

18. A vizsgálatban megfelelően inert anyagból (például üveg, rozsdamentes acél, alumínium, teflon, PVC stb.) készült, részekre bontható vagy nem részekre bontható kimosódási oszlopokat használunk, amelynek belső átmérője legalább 4 cm, magassága pedig legalább 35 cm. Az oszlopok anyagait meg kell vizsgálni a vizsgált vegyi anyaggal és/vagy az átalakulási termékekkel való lehetséges kölcsönhatások szempontjából. A részekre bontható és a nem részekre bontható oszlopokra példákat a 2. melléklet tartalmaz.

19. A talajoszlopok feltöltésére és tömörítésére kanalat, dugattyút és vibrációs berendezéseket használunk.

20. A mesterséges eső talajoszlopokon történő alkalmazására dugattyús vagy perisztaltikus szivattyúkat, zuhanyfejeket, Mariotte-palackokat vagy egyszerű csepegtető tölcséreket lehet használni.

▼M6

Laboratóriumi berendezések és vegyi anyagok

21. Általános laboratóriumi felszerelések, így különösen a következők szükségesek:

(1) analitikai eszközök, mint például GLC-, HPLC-, TLC-berendezés, beleértve a jelölt és nem jelölt vegyi anyagok elemzésére alkalmas, illetve az inverz izotóphígítási módszerben szükséges kimutatási rendszereket;

(2) az anyagok azonosítására alkalmas eszközök (pl. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, stb.);

(3) folyadékszcintillációs számláló a radioaktív izotóppal jelölt vizsgált vegyi anyagokhoz;

(4) oxidáló a jelölt vegyi anyag elégetéséhez;

(5) extrakciós készülék (például centrifugacsövek a hideg extrakcióhoz és Soxhlet-készülék a reflux alatti folyamatos extrakcióhoz);

(6) műszerek az oldatok és kivonatok koncentrálására (pl. rotációs bepárló).

22. A felhasznált vegyszerek a következők: szerves oldószerek, analitikai tisztaságú, mint az aceton, metanol stb.; szcintillációs folyadék; 0,01 mólos $CaCl_2$-oldat desztillált vagy ioncserélt vízben (= mesterséges eső).

Vizsgált vegyi anyag

23. A vizsgált vegyi anyagot a talajoszlopra történő felvitelhez ioncserélt vagy desztillált vízben fel kell oldani. Ha a vizsgált vegyi anyag rosszul oldódik vízben, akkor formulázott termékként (szükség esetén vízben szuszpendálva vagy emulgeálva) vagy bármely szerves oldószerben feloldva lehet alkalmazni. Abban az esetben, ha szerves oldószert használunk, annak mennyiségét minimális szinten kell tartani és a kimosódási eljárás megkezdése előtt a talajoszlop felszínéről el kell párologtatni. A szilárd készítményeket – például a granulátumokat – víz nélkül, szilárd formában kell alkalmazni; a talajoszlop felületén való jobb eloszlás érdekében a formulázott terméket az alkalmazás előtt el lehet keverni kis mennyiségű (pl. 1 g) kvarchomokkal.

24. A talajoszlopokon alkalmazott vizsgált vegyi anyag mennyiségének elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye az alkalmazott dózis legalább 0,5 %-ának kimutatását bármely szegmensben. A növényvédő szerekben lévő hatóanyagok esetében ez a mennyiség a maximális ajánlott használati arányon alapulhat (egyszeri kijuttatási arány), és – a kiindulási és az érlelt anyag kimosódása esetében egyaránt – a használt talajoszlop felületéhez kell viszonyítani ([1]).

Referencia-vegyianyag

25. A kimosódási vizsgálatokban referencia-vegyianyagot kell használni (lásd a 12. pontot). A referencia-vegyianyagot a vizsgált vegyi anyaghoz hasonló módon kell felvinni a talajoszlop felületére, olyan arányban, amely lehetővé

([1]) A hengeres talajoszlopokon alkalmazandó mennyiséget a következő képlettel lehet kiszámítani:

$$M\ [\mu g] = \frac{A\ [kg/ha] \cdot 10^9 [\mu g/kg] \cdot d^2 [cm^2] \cdot \pi}{10^8 [cm^2/ha] \cdot 4}$$

ahol:

M = oszloponként alkalmazott mennyiség [µg]

A = kijuttatási arány [kg/ha]

d = talajoszlop átmérője [cm]

π = 3,14

▼M6

teszi a megfelelő szintű kimutatást, akár belső standardként a vizsgált vegyi anyaggal együtt azonos talajoszlopon, akár önállóan egy külön talajoszlopon alkalmazva. Előnyös, ha mindkét vegyi anyagot ugyanazon az oszlopon futtatjuk, kivéve, ha a két vegyi anyag hasonlóképpen jelölt.

Talajok

A talaj kiválasztása

26. A kiindulási vegyi anyaggal végzett kimosódási vizsgálatokhoz 3–4 eltérő pH-jú, szerves széntartalmú és szerkezetű talajt kell használni (12). A kimosódási vizsgálatokhoz használandó talajok kiválasztására vonatkozó iránymutatás az alábbi 1. táblázatban található. Az ionizálható vizsgált vegyi anyagok esetében a kiválasztott talajoknak széles pH-tartományt kell lefedniük annak érdekében, hogy a vegyi anyag mobilitását ionizált és nem ionizált formában is értékelni lehessen; legalább 3 talajnak olyan pH-val kell rendelkeznie, amely mellett a vizsgált vegyi anyag mobilis formában van.

1. táblázat

Útmutató a kimosódási vizsgálatokhoz használandó talajok kiválasztására

Talaj sorszáma	pH-érték	Szerves szén %	Agyagtartalom %	Állag (*)
1	> 7,5	3,5–5,0	20–40	agyagos vályogtalaj
2	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	iszapos vályogtalaj
3	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	vályogtalaj
4	< 4,0–6,0 §	< 0,5–1,5 § ‡	< 10–15 §	vályogos homoktalaj
5	< 4,5	> 10 #	< 10	vályogos homoktalaj/ homok

(*) A FAO és az USDA rendszerek szerint (14).

§ A megfelelő változók lehetőleg mutassanak értéket a megadott tartományban. Ha azonban nehezen található megfelelő talajanyag, a jelzett minimum alatti értékek is elfogadhatók.

‡ A kevesebb, mint 0,3 % szerves szenet tartalmazó talajok zavarhatják a szervesanyag-tartalom és az adszorpció közötti összefüggést. Ezért minimum 0,3 % szerves szenet tartalmazó talajok használata ajánlott.

A nagyon magas széntartalmú (pl. > 10 %) talajok jogi szempontból elfogadhatatlanok lehetnek pl. növényvédőszerek engedélyezése céljából.

27. Időnként egyéb talajtípusok is szükségesek lehetnek a hidegebb, mérsékelt és trópusi régiók reprezentálására. Ezért ha más talajtípusokat részesítünk előnyben, azokat ugyanazokkal a paraméterekkel kell jellemezni és a tulajdonságok ugyanolyan változékonyságával kell rendelkezniük, mint amelyeket a kimosódási vizsgálatokhoz használandó talajok kiválasztására vonatkozó iránymutatásban leírtak (lásd a fenti 1. táblázatot), akkor is, ha nem felelnek meg pontosan a kritériumoknak.

28. Az „érlelt maradványokkal” végzett kimosódási vizsgálatokhoz egyetlen talajt kell használni (12). Ennek a talajnak > 70 % homoktartalommal és 0,5–1,5 % közötti szerves széntartalommal kell rendelkeznie (pl. a 4. számú talaj az 1. táblázatban). Ha az átalakulási termékekre vonatkozó adatok fontosak, több talajtípus használatára lehet szükség.

29. A talajokat legalább a következő adatokkal kell jellemezni: textúra [homok %, iszap %, agyag % a FAO és az USDA osztályozási rendszer szerint (14)], pH, kationcserélő kapacitás, szerves széntartalom, térfogatsűrűség (bolygatott talajban) és víztartó képesség. A mikrobiális élőanyag-tömeg mérése csak az

▼M6

olyan talajban szükséges, amelyet az érlelt anyag kimosódási vizsgálata előtt végrehajtott érlelés/inkubáció időszakában használunk. A talaj további tulajdonságaira vonatkozó információk (pl. a talaj osztályozása, agyag ásványtan, fajlagos felület) is hasznosak lehetnek a vizsgálat eredményeinek értelmezéséhez. A talaj jellemzőinek meghatározására a (15) (16) (17) (18) (19) szakirodalmi hivatkozásban ajánlott módszerek használhatók.

Talajok gyűjtése és tárolása

30. A talajokat a felső rétegből (A-horizont) kell venni, legfeljebb 20 cm mélységből. A növényzet maradványait, a makrofaunát és a köveket el kell távolítani. A talajokat (kivéve a vizsgált vegyi anyag érlelésére használt talajokat) levegőn, szobahőmérsékleten (lehetőleg 20–25 °C-on) megszárítjuk. A fellazítást minimális erőkifejtéssel kell végezni, hogy a talaj eredeti textúrája a lehető legkisebb mértékben változzon. A talajokat < 2 mm-es rostán átszitáljuk. Ajánlott az óvatos homogenizálás, mivel ez növeli az eredmények reprodukálhatóságát. Felhasználás előtt a talaj szobahőmérsékleten tárolható, és levegőn szárított állapotban kell tartani (12). A tárolás idejére nézve nincs ajánlott korlátozás, de a három évnél tovább tárolt talajokat felhasználás előtt szerves széntartalmuk és pH-értékük tekintetében újra kell elemezni.

31. Rendelkezésre kell állnia a vizsgálati talajok gyűjtésére szolgáló helyszín történetére vonatkozó részletes információknak. A részletek közé tartozik a pontos földrajzi hely (UTM [Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum] segítségével vagy földrajzi koordinátákkal pontosan meghatározva), a növényzettel való borítottság, a növényvédő vegyszerekkel történt kezelések, a szerves és szervetlen műtrágyákkal történt kezelések, a biológiai anyagokkal történt kiegészítések, valamint a véletlen szennyezések (12). A talaj nem használható a kimosódási vizsgálatokban, ha a megelőző négy évben a vizsgált vegyi anyaggal vagy szerkezeti analógjaival kezelték.

Vizsgálati körülmények

32. A vizsgálat során a talaj kimosódási oszlopokat sötétben és szobahőmérsékleten kell tartani, feltéve, hogy ezt a hőmérsékletet a ± 2 °C tartományon belül lehet tartani. Az ajánlott hőmérséklet 18–25 °C között van.

33. A talajoszlopok felszínén folyamatosan mesterséges esőt (0,01 mólos $CaCl_2$) kell alkalmazni 200 mm/48 óra sebességgel ([1]); ez a sebesség 251 ml kijuttatásának felel meg 4 cm-es belső átmérőjű oszlopra vetítve. Ha a vizsgálat céljai megkövetelik, kiegészítésképpen a mesterséges csapadék ettől eltérő sebességeit és hosszabb időtartamokat is lehet használni.

A vizsgálat végrehajtása

A szülő vegyi anyag kimosódása

34. Legalább két párhuzamos kimosódási oszlopot töltünk meg kezeletlen, levegőn szárított és szitált talajjal (< 2 mm) legfeljebb kb. 30 cm magasságig. Az egységes töltés érdekében a talajt kanállal, kis részletekben adjuk hozzá az oszlopokhoz, és az oszlop egyidejű enyhe rezegtetése mellett dugattyúval préseljük, amíg a talajoszlop teteje már nem süllyed tovább.

([1]) Ez a mennyiség rendkívül nagy mennyiségű csapadékot szimulál. Az átlagos éves csapadékmennyiség Közép-Európában például nagyságrendileg 800–1 000 mm.

▼M6

Az egységes feltöltésre azért van szükség, hogy reprodukálható eredményeket lehessen nyerni a kimosódási oszlopokból. Az oszlopfeltöltési technikák részleteit lásd a (20) (21) és (22) szakirodalmi hivatkozásban. A feltöltési eljárás reprodukálhatóságának szabályozása érdekében meghatározott tömegű talajt lehet az oszlopokba tölteni ([1]); a párhuzamos oszlopok tömegének hasonlónak kell lennie.

35. Feltöltés után a talajoszlopokat mesterséges esővel (0,01 mólos $CaCl_2$) előnedvesítjük, mégpedig alulról felfelé a talajpórusokban lévő levegő vízzel való helyettesítése érdekében. Ezt követően a talajoszlopokat hagyjuk egyensúlyi állapotba kerülni, és a felesleges víz a gravitáció hatására lecsorog. Az oszlopok telítésére használt módszerekről a (23) szakirodalom nyújt áttekintést.

36. Ezután alkalmazzuk a vizsgált vegyi anyagot és/vagy a referencia-vegyianyagot a talajoszlopokon (lásd még a 23–25. pontot). Az oldatok, szuszpenziók vagy emulziók homogén eloszlása érdekében a vizsgált vegyi anyagot és/vagy a referencia-vegyianyagot egyenletesen kell alkalmazni a talajoszlopok felületén. Ha a vizsgált vegyi anyag alkalmazása céljából a talajba történő bedolgozás ajánlott, a vizsgált vegyi anyagot el kell keverni kis mennyiségű (például 20 g) talajban, és hozzáadni a talajoszlop felszínéhez.

37. A talajoszlopok felületét ezután lefedjük egy üveg tömörítő koronggal, üveggyöngyökkel, üvegszálas szűrővel vagy kerek szűrőpapírral annak érdekében, hogy a mesterséges esőt az egész felületen egyenletesen lehessen eloszlatni, illetve hogy elkerülhető legyen a vízcseppek okozta zavaró hatás a talaj felszínén. Minél nagyobb az oszlop átmérője, annál nagyobb gondot kell fordítani a mesterséges eső talajoszlopokra történő felvitelére, hogy biztosítható legyen a mesterséges eső egyenletes eloszlása a talaj felszínén. Ezután a mesterséges esőt cseppenként adjuk hozzá a talajoszlopokhoz dugattyú, perisztaltikus pumpa, vagy csepegtető tölcsér segítségével. A csurgalékvizet lehetőleg frakciókban kell gyűjteni és fel kell jegyezni azok térfogatát ([2]).

38. A kimosódás és az oszlopok lecsorgása után a talajoszlopokat a vizsgálattól várt információktól függő megfelelő számú szegmensre vágjuk, majd a szegmenseket megfelelő oldószerekkel vagy oldószer-keverékekkel extraháljuk és analizáljuk a vizsgált vegyi anyagra, illetve – adott esetben – az átalakulási termékekre, az össze radioaktivitásra és a referencia-vegyianyagra. A kimosott vagy csurgalékvíz-frakciókat közvetlenül vagy ugyanezen termékek extrakcióját követően analizáljuk. Radioaktív izotóppal jelölt vizsgált vegyi anyag használatakor az alkalmazott radioaktivitás legalább 10 %-át tartalmazó összes frakciót azonosítani kell.

Az érlelt maradványok kimosódása

39. A friss (előzetesen levegőn nem szárított) talajt olyan arányban kezeljük a radioaktív izotóppal jelölt vizsgált vegyi anyaggal, amely megfelel a talajoszlopok felületének (lásd a 24. pontot), és a C.23. vizsgálati módszer szerint aerob körülmények között inkubáljuk (13). Az inkubálás (érlelés) időtartamának elegendően hosszúnak kell lennie ahhoz, hogy jelentős

([1]) Példák a bolygatott talajok térfogatsűrűségére:homoktalaj esetén 1,66 g/ml
vályogos homoktalaj esetén 1,58 g/ml
vályogtalaj esetén 1,17 g/ml
iszaptalaj esetén 1,11 g/ml

([2]) A csurgalékvíz tipikus térfogata 230–260 ml között mozog, amely 4 cm átmérőjű és 30 cm hosszúságú talajoszlopok használata esetén az alkalmazott összes mesterséges eső (251 ml) kb. 92–104 %-ának felel meg.

▼M6

mennyiségű átalakulási termék keletkezzen; a vizsgált vegyi anyag felezési ideje felének megfelelő érlelési idő ajánlott ([1]), de nem haladhatja meg a 120 napot. A kimosódás előtt az érlelt talajt analizáljuk a vizsgált vegyi anyagra és átalakulási termékeire.

40. A kimosódási oszlopokat 28 cm-es magasságig töltjük fel ugyanazzal a (de levegőn szárított) talajjal, mint amelyet a 34. pontban leírt érlelési kísérletben használtunk, és meghatározzuk a feltöltött talajoszlopok teljes tömegét. A talajoszlopokat ezután a 35. pontban leírtak szerint előnedvesítjük.

41. Ezt követően a vizsgált vegyi anyagot és átalakulási termékeit érlelt talajmaradékok formájában (lásd a 39. pontot), 2 cm-es talajszegmensként alkalmazzuk a talajoszlopok felszínén. A talajoszlopok teljes magassága (kezeletlen talaj + érlelt talaj) lehetőleg ne haladja meg a 30 cm-t (lásd a 34. pontot).

42. A kimosást a 37. pontban leírtak szerint végezzük.

43. Kimosódás után a talajszegmenseket és csurgalékvizet a 38. pontban megadottak szerint analizáljuk a vizsgált vegyi anyagra, átalakulási termékeire és a nem-kivont radioaktivitásra. Annak meghatározására, hogy a kimosódás után az érlelt maradék mekkora hányada marad vissza a felső 2 cm-es rétegben, ezt a szegmenst külön kell elemezni.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

44. A vizsgált vegyi anyag, az átalakulási termékek, a nem kivonható anyagok és – ha van – a referencia-vegyianyag mennyiségét az alkalmazott kezdeti dózis %-ában kell megadni mindegyik talajszegmens és csurgalékvíz-frakció vonatkozásában. Az oszlopok eredményeit grafikusan is ábrázolni kell, a kapott százalékokat a talajmélység függvényében ábrázolva.

45. Amikor referencia-vegyianyag is szerepel az oszlopkimosódási vizsgálatokban, a vegyi anyag kimosódását relatív skálán lehet értékelni a relatív mobilitási tényezők (relative mobility factor, RMF; a fogalom meghatározását lásd a 3. mellékletben) (1) (11) használatával, ami lehetővé teszi a különféle vegyi anyagok különböző talajtípusokban kapott kimosódási adatainak összehasonlítását. A különböző növényvédő vegyi anyagok RMF-értékeinek példái a 3. függelékben találhatók.

46. Az oszlopkimosódási eredményekből a K_{oc} (szerves szén normalizált adszorpciós együttható) és a K_{om} (szerves anyag normalizált eloszlási együttható) becsült értékeit is meg lehet kapni az átlagos kimosódási távolság vagy az RMF és a K_{om}, illetve a K_{oc} (4) között megállapított összefüggések felhasználásával, vagy az egyszerű kromatográfiás elmélet alkalmazásával (24). Az utóbbi módszert azonban körültekintően kell alkalmazni, különösen, ha figyelembe vesszük, hogy a kimosódási folyamatban nem kizárólag telített áramlási viszonyok, hanem inkább telítetlen rendszerek játszanak szerepet.

([1]) Egynél több fő átalakulási termék is képződhet a talajban, amelyek különböző időpontokban jelenhetnek meg az átalakulási vizsgálat során. Ilyen esetekben szükség lehet arra, hogy különböző korú érlelési maradványokkal is elvégezzük a kimosódási vizsgálatokat.

▼M6

Az eredmények értelmezése

47. Az e módszerben ismertetett oszlopkimosódási vizsgálatok lehetővé teszik a vizsgált vegyi anyag (a kiindulási anyag kimosódási vizsgálatában) és/vagy átalakulási termékei (az érlelt maradványok kimosódási vizsgálatában) kimosódási vagy mobilitási potenciáljának meghatározását a talajban. Ezek a vizsgálatok mennyiségileg nem jelzik előre a terepi körülmények közötti kimosódási viselkedést, de felhasználhatók egy vegyi anyag „kimosódási képességének" olyan vegyi anyagokéval való összehasonlítására, amelyek kimosódási viselkedése esetleg már ismert (24). Hasonlóképpen, az alkalmazott vegyi anyag talajvízbe esetleg bejutó százalékos arányát sem mérik mennyiségileg (11). Az oszlopkimosódási vizsgálatok eredményei azonban segíthetnek annak eldöntésében, hogy kell-e további félterepi vagy terepi vizsgálatokat végezni olyan vegyi anyagok esetében, amelyek a laboratóriumi vizsgálatok során fokozott mobilitási potenciált mutatnak.

Vizsgálati jegyzőkönyv

48. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag és referencia-vegyianyag (ha van):

— közönséges név, kémiai név (IUPAC- és CAS-nómenklatúra), CAS-szám, kémiai szerkezet (megadva a jelölőanyag helyzetét, ha radioaktív izotóppal jelölt anyagot használunk) és fontos fizikai-kémiai tulajdonságok;

— a vizsgált vegyi anyag kémiai tisztasága (szennyezettsége);

— az izotóppal jelölt vegyi anyag radiokémiai tisztasága és specifikus aktivitása (ahol szükséges).

Vizsgálati talajok:

— a gyűjtőhelyre vonatkozó adatok;

— a talajok tulajdonságai, mint például a pH, a szerves szén- és az agyagtartalom, textúra és térfogatsűrűség (bolygatott talaj esetén);

— a talaj mikrobiális aktivitása (csak a vizsgált vegyi anyag érlelésére használt talaj esetén);

— a talaj tárolásának hossza és a tárolási körülmények.

Vizsgálati feltételek:

— a vizsgálatok elvégzésének időpontja;

— a kimosódási oszlopok hossza és átmérője;

— a talajoszlopokban lévő talaj összes tömege;

— a vizsgált vegyi anyag és – adott esetben – az alkalmazott referencia-vegyianyag mennyisége;

— a mesterséges eső mennyisége, gyakorisága és alkalmazásának időtartama;

— a kísérleti összeállítás hőmérséklete;

— az ismétlések száma (legalább kettő);

— a különböző talajszegmensekben és csurgalékvizekben található vizsgált vegyi anyag, az átalakulási termékek, és adott esetben a referencia-vegyianyag analitikai módszerei;

— a talajszegmensekben és csurgalékvizekben található átalakulási termékek jellemzésére és azonosítására használt módszerek.

▼**M6**

Vizsgálati eredmények:

— a talajszegmensek és a csurgalékvizek koncentrációban és az alkalmazott dózis %-ában kifejezett eredményeinek táblázatai;

— tömegegyensúly, ha szükséges;

— csurgalékvíz-térfogatok;

— kimosódási távolságok és – adott esetben – a relatív mobilitási tényezők;

— a talajszegmensekben talált %-ok grafikus ábrázolása a talajszegmens mélységének függvényében;

— az eredmények szöveges elemzése és értelmezése.

SZAKIRODALOM

(1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinel Flora, Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.

(2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals – T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.

(3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.

(4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.

(5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.

(6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(8) A növényvédő szerek forgalomba hozataláról szóló 91/414/EGK tanácsi irányelv módosításáról szóló 95/36/EK bizottsági irányelv (1995. július 14.) I. melléklete, HL L 172., 1995.7.22., 8. o.

(9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.

(11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(13) E melléklet következő fejezetei:

A.4. fejezet: Gőznyomás

A.6. fejezet: Vízoldékonyság

▼**M6**

A.8. fejezet: Megoszlási hányados, lombikrázásos módszer

A.24. fejezet: Megoszlási hányados, HPLC-módszer

C.7. fejezet: Lebomlás – Abiotikus lebomlás: hidrolízis a pH függvényében

C.18. fejezet: Adszorpció/deszorpció tétel egyensúlyi módszerrel

C.23. fejezet: Aerob és anaerob átalakítás a talajban

(14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).

(15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

(19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.

(21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.

(22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): 49-53.

(23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. – A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177-217.

(24) (Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.

(25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris

▼M6

1. függelék

Fogalommeghatározások és mértékegységek

Érlelt talajmaradvány: A vizsgált vegyi anyag és az átalakulási termékek előfordulása a talajban a kijuttatást követően egy olyan időtartam után, amely elég hosszú ahhoz, hogy lehetővé tegye, hogy az alkalmazott vegyi anyag egy részének eloszlása és kémiai jellege szállítási, adszorpciós, metabolikus és szétterjedési folyamatok révén megváltozzon (1).

Mesterséges eső: 0,01 mólos $CaCl_2$-oldat desztillált vagy ioncserélt vízben.

Átlagos kimosódási távolság: A talajszakasz alsó része, ahol az összes visszanyert vizsgált vegyi anyag 50 %-a kumulálódik [normál kimosódási kísérlet], vagy (az alsó talajszakasz, ahol az összes visszanyert vizsgált vegyi anyag 50 %-a kumulálódik) – ((érlelt maradványréteg vastagsága)/2) [érlelt maradvány kimosódási vizsgálat]

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Csurgalékvíz: Egy talajprofilon vagy talajoszlopon keresztülszivárogtatott vizes fázis (1).

Kimosódás: Az a folyamat, amelynek során egy vegyi anyag lefelé mozog a talajprofilban vagy a talajoszlopban (1).

Kimosódási távolság: Az a legmélyebb talajszegmens, amelyben az alkalmazott vizsgált vegyi anyag vagy érlelt szermaradvány ≥ 0,5 %-a található a kimosódási folyamat után (egyenértékű a behatolási mélységgel).

Kimutatási határérték (LOD) és mérhetőségi határérték (LOQ): A kimutatási határérték (LOD) az adott vegyi anyagnak az a koncentrációja, amely alatt a vegyi anyag egyértelmű azonosításához szükséges jel nem különböztethető meg az analitikai háttérzajtól. A mérhetőségi határérték (LOQ) az adott vegyi anyagnak az a koncentrációja, amely alatt a koncentráció nem határozható meg elfogadható pontossággal.

RMF Relatív Mobilitási Tényező: (vizsgált vegyi anyag kimosódási távolsága (cm)) / (referencia-vegyianyag kimosódási távolsága (cm))

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

Átalakulási termék: A vizsgált vegyi anyag biotikus vagy abiotikus átalakulási reakcióiból származó minden vegyi anyag, beleértve a CO_2-t és a maradványokban kötött termékeket.

Talaj: Ásványi és szerves kémiai összetevők keveréke, az utóbbi magas szén- és nitrogén-tartalmú és nagy molekulatömegű vegyületeket tartalmaz, amelyben jellemzően kicsi (főleg mikro-) organizmusok élnek. A talajt két állapotában lehet kezelni:

— nem bolygatott, ahogyan a talaj az idő folyamán, a különböző talajtípusok jellegzetes rétegeiben kialakul;

— bolygatott, ahogyan a szántóföldeken általában megtalálható, vagy ahogyan az ásással vett mintákban és a vizsgálati módszerben használt a mintákban előfordul (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: Inherens biológiai lebonthatóság a talajban (elfogadva: 1981. május 12.).

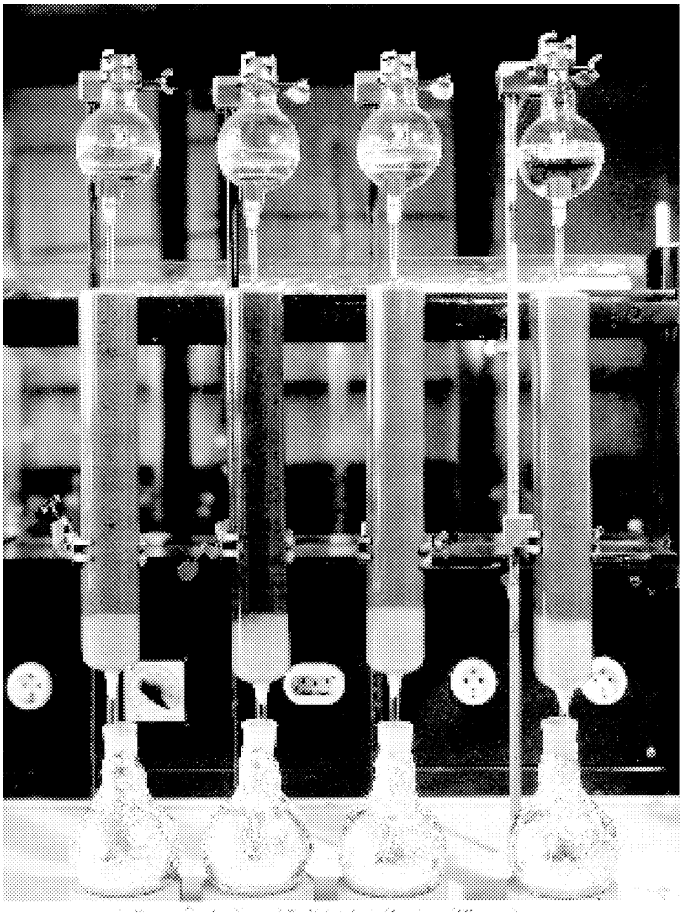
▼M6

2. függelék

1. ábra

Példa az üvegből készült nem részekre bontható kimosódási oszlopra

Hossza 35 cm, belső átmérője 5 cm (1)

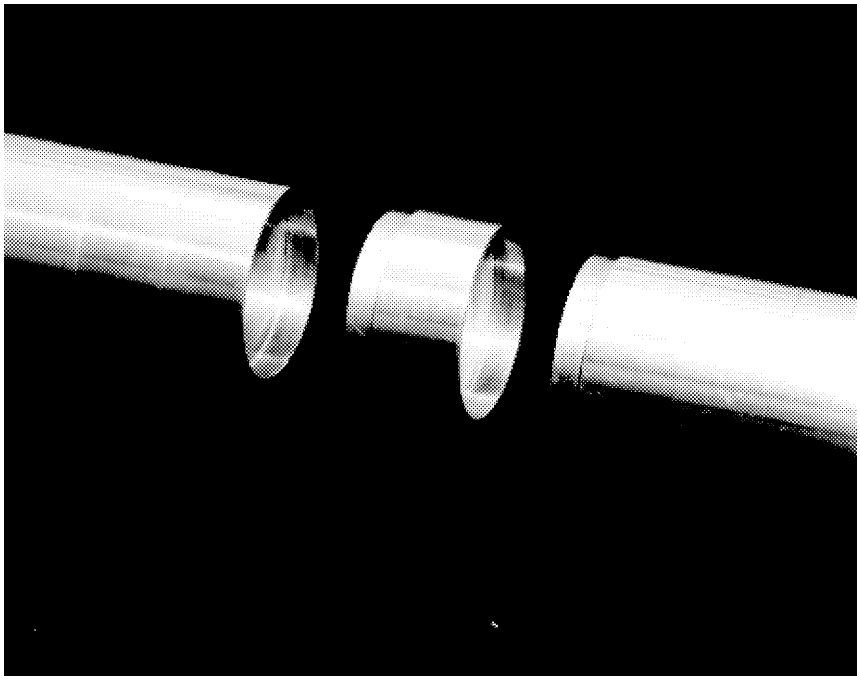


(1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden – 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

▼**M6**

2. ábra

Példa a 4 cm-es belső átmérőjű részekre bontható fémoszlopra (1)



(1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

▼M6

3. függelék

A relatív mobilitási tényezők (*) (RMF) példái különböző növényvédő vegyszerek esetében (1) (2), illetve az ennek megfelelő mobilitási osztályok (+)

RMF-tartomány	Vegyi anyag (RMF)	Mobilitási osztály
≤ 0,15	Paration (< 0,15), Flurodifen (0,15)	I. immobilis
0,15–0,8	Profenofosz (0,18), Propikonazol (0,23), Diazinon (0,28), Diuron (0,38), Terbutilazin (0,52), Metidation (0,56), Prometrin (0,59), Propazin (0,64), Alaklór (0,66), Metolaklór (0,68)	II. enyhén mobilis
0,8–1,3	Monuron (**) (1,00), Atrazin (1,03), Simazin (1,04), Fluometuron (1,18)	III. mérsékelten mobilis
1,3–2,5	Prometon (1,67), Cianazin (1,85), Bromacil (1,91), Karbutilate (1,98)	IV. meglehetősen mobilis
2,5–5,0	Karbofurán (3,00), Dioxakarb (4,33)	V. mobilis
> 5,0	Monokrotofosz (> 5,0), Dikrotofosz (> 5,0)	VI. nagyon mobilis

(*) A relatív mobilitási tényező a következőképpen kapható meg (3):

$$\text{RMF} = \frac{\text{vizsgált vegyi anyag kimosódási távolsága(cm)}}{\text{referencia} - \text{vegyianyag kimosódási távolsága(cm)}}$$

(**) Referencia-vegyianyag

\+ A vegyi anyagok talajban való mobilitásának egyéb osztályozási rendszerei a talaj vékonyréteg-kromatográfiából származó R_f-értékeken \big(4) és a K_{oc}-értékeken alapulnak (5) (6).

(1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium „Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment". Canterbury, UK, 1-3 July 1985.

(2) Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.

(3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.

(4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.

(5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

(6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165-174.

▼M6

C.45. A KONZERVÁLÓSZERREL KEZELT FAANYAGOKBÓL A KÖRNYEZETBE TÖRTÉNŐ KIBOCSÁTÁSOK BECSLÉSE: LABORATÓRIUMI MÓDSZEREK FÁBÓL KÉSZÜLT, NEM FEDETT, ÉDES- VAGY TENGERVÍZZEL ÉRINTKEZÉSBEN LÉVŐ ÁRUCIKKEK VIZSGÁLATÁRA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 313. vizsgálati iránymutatásában (2007) leírt módszerrel. A konzerválószerrel kezelt faanyagból a környezetbe történő kibocsátást a kezelt faanyaghoz kapcsolódó környezeti kockázatértékelés céljából számszerűsíteni kell. Ez a vizsgálati módszer egy laboratóriumi módszert ír le a konzerválószerrel kezelt fanyagból származó kibocsátások becslésére két olyan esetben, amikor a kibocsátások a környezetbe juthatnak:

   — Az édesvízzel érintkező kezelt faanyagból származó kibocsátások. A kezelt faanyag felszínéről származó kibocsátások a vízbe kerülhetnek.

   — A tengervízzel érintkező kezelt faanyagból származó kibocsátások. A kezelt faanyag felszínéről származó kibocsátások a tengervízbe kerülhetnek.

2. Ez a vizsgálati módszer olyan faanyagok és fából készült termékek kibocsátásainak ellenőrzésére szolgál, amelyek nincsenek lefedve és édesvízzel vagy tengervízzel érintkezésben állnak. A használati osztályok nemzetközileg alkalmazottak, és azt a biológiai veszélyt kategorizálják, amelynek a kezelt árucikk ki lesz téve. A használati osztályok meghatározzák azt a helyzetet is, amelyben a kezelt árucikket használják, és meghatározzák azokat a környezeti elemeket (levegő, víz, talaj), amelyekre nézve a konzerválószerrel kezelt faanyag potenciálisan kockázatot jelent.

3. A vizsgálati módszer egy laboratóriumi eljárás, amely olyan vízminták (emisszátum) expozíció utáni növekvő időközönként történő gyűjtésére irányul, amelyekbe kezelt faanyagot merítettek. A fluxus mg/m^2/nap mértékegységben történő becsléséhez az emisszátumban lévő kibocsátott mennyiséget a faanyag felületéhez és az expozíció időtartamához viszonyítjuk. Így megbecsülhető az expozíció növekvő időszakai utáni fluxus mértéke (a kimosódási sebesség).

4. A kibocsátott mennyiséget a kezelt faanyaghoz kapcsolódó környezeti kockázatok értékelésére lehet használni.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

5. A fafelület édesvíz révén bekövetkező kimosódásának mechanizmusa jellegében és súlyosságában feltételezhetően nem egyezik meg a fafelület tengervíz révén történő kimosódásával. Így a tengervízi környezetben használt faanyagok kezelésére alkalmazott fakonzerváló termékek vagy keverékek esetében tengervíz vonatkozásában végzett kimosódási vizsgálatra van szükség.

6. Fakonzerváló szerrel kezelt faanyag esetében a faanyagnak a kereskedelmi forgalomban használt faanyagra nézve reprezentatívnak kell lennie. A faanyagot a konzerválószer gyártójának utasításai szerint, illetve a megfelelő szabványokkal és előírásokkal összhangban kell kezelni. A faanyag kezelés utáni kondicionálásának paramétereit a vizsgálat megkezdése előtt meg kell állapítani.

7. A használt famintáknak reprezentatívaknak kell lenniük a használt árukra nézve (pl. faj, sűrűség és egyéb jellemzők tekintetében).

▼M6

8. A vizsgálat alkalmazható behatolásos folyamattal vagy felületre történő felvitellel kezelt faanyagra, illetve olyan kezelt faanyagra, amely további kötelező felületkezelést kapott (például olyan festéket, amelyet a kereskedelmi felhasználás követelményeként visznek fel).

9. A víz összetétele, mennyisége, pH-ja és fizikai formája fontos szempont a faanyagból származó kibocsátás mennyiségének, tartalmának és jellegének meghatározásában.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

10. Konzerválószerrel kezelt faanyagból vett vizsgálati mintadarabokat merítünk el vízben. A vizet (emisszátum) összegyűjtjük és az expozíciós idő alatt több – a statisztikai számítások elvégzéséhez elegendő – alkalommal kémiai analízisnek vetjük alá. A mg/m^2/nap mértékegységben megadott kibocsátási rátákat az analitikai eredményekből számítjuk ki. A mintavételi időszakokat fel kell jegyezni. A kezeletlen mintákkal végzett vizsgálatokat fel lehet függeszteni, ha nem mutatható ki háttérszint az első három adatpontban.

11. A kezeletlen fa mintadarabok vizsgálatba való bevonása lehetővé teszi a faanyagból származó – az alkalmazott konzerválószertől eltérő – emissziótumok háttérszintjének meghatározását.

MINŐSÉGI KRITÉRIUMOK

Pontosság

12. A vizsgálati módszer pontossága a kibocsátás becslése szempontjából attól függ, hogy a vizsgálati minadarabok reprezetatívak-e a kereskedelemben kapható kezelt faanyagokra nézve, hogy mennyire reprezentatív a víz az igazi vízre nézve, és hogy mennyire reprezentatív az expozíció a természetes körülmények tekintetében.

13. Az analitikai módszer pontosságát, precizitását és ismételhetőségét a vizsgálat elvégzése előtt meg kell határozni.

Reprodukálhatóság

14. Három vízmintát veszünk és analizálunk, majd az átlagos értéket tekintjük kibocsátási értéknek. Az eredmények laboratóriumon belüli és a különböző laboratóriumok közötti reprodukálhatósága a bemerítés rendszerétől és a vizsgálati mintadarabokként felhasznált faanyagtól függ.

Az eredmények elfogadható tartománya

15. E vizsgálatban az eredmények olyan tartománya fogadható el, ahol a felső és alsó értékek közötti különbség egy nagyságrendnél kisebb.

VIZSGÁLATI FELTÉTELEK

Víz

16. Édesvízi kimosódási forgatókönyvek: Ha édesvíznek kitett faanyagot kell értékelni, akkor a kimosódási próba során ioncserélt víz (pl. ASTM D 1193 Type II) használata ajánlott. A víz hőmérséklete 20 °C +/– 2 °C legyen és a mért pH-értéket és a víz hőmérsékletét a vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell. A használt vízből a kezelt mintadarabok bemerítése előtt vett minták analízise lehetővé teszi a vizsgált vegyi anyagoknak a vízben történő becslését. Ez egy ellenőrzés azon vegyi anyagok háttérszintjeinek meghatározására, amelyek majd kémiai elemzésre kerülnek.

▼M6

17. A tengervízbe való kimosódás forgatókönyvei: Ha tengervíznek kitett faanyagot kell értékelni, akkor a kimosódási próba során szintetikus tengervíz (pl. ASTM D 1141 Substitute Ocean Water, nehézfémek nélkül) használata ajánlott. A víz hőmérséklete 20 °C ± 2 °C legyen, és a mért pH-értéket és a víz hőmérsékletét a vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell. A használt vízből a kezelt mintadarabok bemerítése előtt vett minták analízise lehetővé teszi a vizsgált vegyi anyagoknak a vízben történő becslését. Ez az ellenőrzés a fontos vegyi anyagok háttérszintjeinek elemzésére szolgál.

Faanyagú vizsgálati mintadarabok

18. A fafajnak a fakonzerváló szerek hatékonysági vizsgálatai során használt fafajok jellegzetes képviselőjének kell lennie. Az ajánlott fajok a *Pinus sylvestris* L. (erdeifenyő), a *Pinus resinosa* Ait. (vörösfenyő), vagy a *Pinus*-fajok (déli fenyő). További vizsgálatok végezhetők egyéb fajok használatával.

19. Görcsmentes, egyenes szálirányú faanyagot kell használni. Kerülni kell a gyantás megjelenésű anyagokat. A faanyagnak jellegzetes, a kereskedelmi forgalomban kapható faanyagnak kell lennie. A beszerzési forrást, a sűrűséget és az évgyűrűk 10 mm-enkénti számát fel kell jegyezni.

20. Ajánlott, hogy a faanyagú vizsgálati mintadarabok öt darab, az EN 113 szabvány szerinti méretű (25 mm × 50 mm × 15 mm) blokkból álló tételeket képezzenek, és hosszanti felületük párhuzamos legyen a faanyag szálirányával, bár egyéb méretek – mint az 50 mm × 150 mm × 10 mm – is használhatók. A vizsgálati darabokat teljesen el kell meríteni a vízben. A vizsgálati daraboknak 100 %-ban szíjácsból kell állnia. Minden darabot egyedileg megjelölünk, hogy a vizsgálat alatt azonosítani lehessen.

21. A vizsgálati mintadarabokat le kell gyalulni vagy le kell síkfűrészelni, de a felületeket nem szabad lecsiszolni.

22. Az elemzésre használt faanyagú vizsgálati mintadarabok tételeinek száma legalább öt legyen: a mintadarabok három tételét konzerválószerrel kezeljük, egy tétel kezeletlen marad, egy tételt pedig a vizsgálati mintadarabok sütőben szárított nedvességtartalmának kezelés előtti becslésére használunk. Elegendő számú vizsgálati mintadarabot készítünk ahhoz, hogy ki lehessen választani három olyan tételt, amelyekben a konzerválószer retenciója az együtt tekintett vizsgálati mintadarabok átlagos értékének 5 %-os tartományán belül van.

23. Minden vizsgálati mintadarab bütüjét le kell zárni olyan vegyi anyaggal, amely meggátolja a konzerválószernek a mintadarabok bütüjébe történő behatolását, illetve megakadályozza a mintadarabokból a bütükön keresztül történő kimosódást. A bütüzáró alkalmazása szempontjából különbséget kell tenni a felületre való felvitelre és a behatolásos folyamatokra használt mintadarabok között. Kezelés előtt bütüzárót csak a felületre való felvitel esetében kell alkalmazni.

24. A bütünek a behatolásos folyamatok révén történő kezelés céljából nyitva kell állnia. Ezért a darabok bütüjét a kondicionálási időszak végén kell lezárni. A kibocsátást csak a hosszanti felület tekintetében kell megbecsülni. A záróanyagokat ellenőrizni és – szükség esetén – a kimosódás megkezdése előtt újból alkalmazni kell; a kimosódás megkezdése után a záróanyagot már nem szabad újra alkalmazni.

▼M6

Merítőtartály

25. A tartály inert anyagból készüljön, és elég nagy legyen ahhoz, hogy elférjen benne 5 db EN 113 szerinti faanyagú mintadarab 500 ml vízben úgy, hogy az 0,4 cm^2/ml felület-víztérfogat arányt eredményezzen.

Mintavizsgálati állvány

26. A vizsgálati mintadarabokat egy olyan állvány támasztja alá, amely lehetővé teszi, hogy a mintadarabok valamennyi kitett felülete érintkezzen a vízzel.

A KONZERVÁLÓSZERREL TÖRTÉNŐ KEZELÉSI ELJÁRÁS

A kezelt vizsgálati mintadarabok elkészítése

27. A vizsgált konzerválószerrel kezelendő faanyagú vizsgálati mintadarabot a konzerválószerhez megadott eljárás szerint kezeljük, amely behatolásos folyamat vagy felületre való felvitel lehet, és ez utóbbit alámerítéssel, permetezéssel vagy ecseteléssel lehet elvégezni.

Behatolásos kezelési eljárással alkalmazandó konzerválószerek

28. A konzerválószerből olyan oldatot kell készíteni, amely a behatolásos kezelési eljárás alkalmazása esetén biztosítja a meghatározott felvételt vagy retenciót. Megmérjük a faanyagú vizsgálati mintadarab tömegét és méreteit. A behatolásos kezelési folyamatnak meg kell egyeznie a konzerválószernek a 4. vagy 5. használati osztályba sorolt faanyagok esetére meghatározott alkalmazásával. A darabot a kezelés után ismét lemérjük és a konzerválószer retencióját (kg/m^3) a következő egyenlettel számítjuk ki:

$$\frac{\text{Kezelés utáni tömeg(kg)} - \text{Kezelés előtti tömeg(kg)}}{\text{Vizsgálati minta térfogata}(m^3)} \times \frac{\text{Oldatkoncentráció(tömeg/tömeg \%)}}{100}$$

29. Megjegyzendő, hogy a vizsgálatban az ipari kezelőtelepeken \big(pl. vákuumimpregnálással) kezelt faanyagok is használhatók. Az alkalmazott eljárásokat fel kell jegyezni, és az ilyen módon kezelt anyag retencióját elemezni kell és fel kell jegyezni.

Felületre felvitt konzerválószerek

30. A felületre való felvitel eljárásai közé tartozik a faanyagú vizsgálati darabok alámerítése, permetezése és ecsetelése. A folyamatnak és a felviteli aránynak (pl. liter/m^2) meg kell egyeznie a konzerválószer felületi alkalmazásához megadott folyamattal és felviteli aránnyal.

31. Ebben az esetben is megjegyzendő, hogy a vizsgálatban az ipari kezelő telepeken kezelt faanyagok is használhatók. Az alkalmazott eljárásokat fel kell jegyezni, és az ilyen módon kezelt anyag retencióját elemezni kell és fel kell jegyezni.

A vizsgálati mintadarabok kezelést követő kondicionálása

32. A kezelés után a kezelt vizsgálati mintadarabokat a konzerválószer szállítójának ajánlásaival összhangban, a konzerválószer címkéjén szereplő követelményeknek, a kereskedelmi kezelési gyakorlatnak, vagy az EN 252 szabványnak megfelelően kondicionálni kell.

▼M6

A vizsgálati mintadarabok előkészítése és kiválasztása

33. A kezelést követő kondicionálás után kiszámítjuk a vizsgálati mintadarabok átlagos retencióját, és a kimosódási mérésekhez véletlenszerűen kiválasztunk három reprezentatív tételt, amely a csoport átlagos retenciójához viszonyított 5 %-os tartományon belül van.

A KONZERVÁLÓSZER-KIBOCSÁTÁS MÉRÉSE

Immerziós módszer

34. A vizsgálati mintadarabokat lemérjük, majd ezt követően teljesen alámerítjük a vízben, és feljegyezzük a dátumot és az időpontot. A tartályt a párolgás csökkentése érdekében lefedjük.

35. A vizet az alábbi időpontokban cseréljük: 6 óra, 1 nap, 2 nap, 4 nap, 8 nap, 15 nap, 22 nap és 29 nap elteltével (megjegyzés: ezek összesített időtartamok és nem időintervallumok). Fel kell jegyezni a vízcsere időpontját és dátumát, valamint a tartályból visszanyert víz tömegét.

36. További kémiai elemzés céljából minden vízcsere után megtartunk egy mintát a vizsgálati mintadarabok adott tételének bemerítésére szolgáló vízből.

37. A mintavételi eljárás lehetővé teszi a kibocsátott mennyiség / idő profil kiszámítását. A mintákat olyan körülmények között tároljuk, amelyek megőrzik az elemzett anyagot, pl. hűtőszekrényben és sötétben, hogy lecsökkentsük a mikrobák elszaporodását a mintában az elemzés előtt.

KIBOCSÁTÁSI MÉRÉSEK

Kezelt minták

38. Az összegyűjtött vizet kémiailag analizáljuk a hatóanyagra és/vagy a releváns bomlástermékekre/átalakulási termékekre.

Kezeletlen minták

39. Ebben a rendszerben a víz (emisszátum) gyűjtése és a kezeletlen famintákból kimosódott vegyi anyagok ezt követő elemzése lehetővé teszi a konzerválószer kezeletlen faanyagból való lehetséges kibocsátási rátájának becslését. Az emisszátum egyre hosszabb expozíciós időszakok utáni gyűjtése és elemzése lehetővé teszi a kibocsátási ráta idő függvényében történő változásának becslését. Ez az elemzés egy olyan ellenőrzés a vizsgált anyag kezeletlen faanyagban lévő háttérszintjének megállapítására, amellyel igazolható, hogy a minták forrásaként használt faanyagot korábban nem kezelték a konzerválószerrel.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Kémiai elemzések

40. Az összegyűjtött vizet kémiai analízisnek vetjük alá, és a vízanalízis eredményét megfelelő mértékegységben (pl. μg/l-ben) fejezzük ki.

Adatok jegyzőkönyvezése

41. Minden eredményt feljegyzünk. A függelék bemutat egy példát a kezelt vizsgálati mintadarabok egy tétele részére javasolt jegyzőkönyv formátumára, illetve egy összefoglaló táblázatot az egyes mintavételi intervallumokban megfigyelt átlagos kibocsátásértékek kiszámításához.

42. A mg/m^2/nap mértékegységben megadott napi kibocsátási fluxust úgy számítjuk ki, hogy a három ismétlés három mérésének átlagát elosztjuk a bemerítés napjainak számával.

▼M6

Vizsgálati jegyzőkönyv

43. A vizsgálati jegyzőkönyvnek legalább az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— A vizsgálat alatt álló konzerválószer szállítójának neve;

— A vizsgált konzerválószer különleges és egyedi neve vagy kódja;

— A hatóanyag(ok) kereskedelmi vagy közönséges neve a segédanyagok (pl. segédoldószer, gyanta) általános leírásával, valamint az összetétel az összetevők m/m %-ában megadva;

— A vízzel érintkezve használt faanyagokra megadott retenció vagy terhelés (kg/m^3 vagy l/m^2);

— A felhasznált fafaj, annak sűrűsége és növekedési üteme gyűrű/10 mm mértékegységben megadva;

— A vizsgált konzerválószer terhelése és retenciója, valamint a retenció kiszámítására használt képlet l/m^2 vagy kg/m^3 mértékegységben kifejezve;

— A konzerválószer alkalmazásának módja, meghatározva a behatolásos folyamathoz használt kezelés ütemezését, illetve az alkalmazás módja, ha a felületi kezelést használtak;

— A konzerválószer alkalmazásának időpontja, valamint a vizsgálati mintadarabok becsült nedvességtartalma százalékban kifejezve;

— Az alkalmazott kondicionálási eljárások, megjelölve azok jellegét, körülményeit és időtartamát;

— A használt bütüzáró specifikációja, illetve alkalmazásainak száma;

— A faanyag bármely későbbi kezelésének adatai, pl. a festék szállítója, típusa, jellemzői és terhelése;

— Az immerziós események időpontja és dátuma, a vizsgálati mintadarabok alámerítéséhez használt víz mennyisége az egyes események során, és a faanyag által az alámerítés során felszívott víz mennyisége;

— A leírt módszertől való eltérések, illetve minden olyan tényező, amely befolyásolhatta az eredményeket.

SZAKIRODALOM

(1) EN 84:1997 európai szabvány: Faanyagvédő szerek. Kezelt faanyagok biológiai vizsgálatok előtti gyorsított érlelése. Kimosódási eljárás.

(2) EN 113/A1:2004 európai szabvány: Faanyagvédő szerek. Vizsgálati módszer a fát megtámadó basidiomycetes elleni védő hatékonyság meghatározására. A toxikus értékek meghatározása.

(3) EN 252:1989 európai szabvány: Terepi vizsgálati módszer a talajjal érintkező faanyagvédő szerek relatív védő hatékonyságának vizsgálatához.

(4) EN 335 európai szabvány – 1. rész: 2006. A faanyagok és a fa alapanyagú termékek tartóssága – A használati osztályok meghatározása – 1. rész: Általános tudnivalók.

(5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 – 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.

(6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II – 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

▼M6

1. függelék

A vizsgálati módszer adatfelvételi űrlapjának mintája

A konzerválószerrel kezelt faanyagokból származó környezeti kibocsátások becslése: Laboratóriumi módszerek fából készült, nem fedett, édes- vagy tengervízzel érintkezésben lévő árucikkek vizsgálatára

Vizsgálati létesítmény	

Fakonzerváló szer

A konzerválószer szállítója	
A konzerválószer különleges és egyedi neve vagy kódja	
A konzerválószer kereskedelmi vagy közönséges neve	
Segédanyagok	
Vonatkozó retenciós érték vízzel érintkezve használt faanyag esetében	

Alkalmazás

Az alkalmazás módja	
Az alkalmazás dátuma	
A retenció kiszámításához használt képlet:	
Kondicionálási eljárás	
A kondicionálás időtartama	
Bütüzáró / alkalmazások száma	
Utólagos kezelés	adott esetben

Vizsgálati mintadarabok

Fafaj	
A fa sűrűsége	(minimum … átlagérték … maximum)
Növekedési ütem (gyűrű/10 mm)	(minimum … átlagérték … maximum)
Nedvességtartalom	

▼M6

Vizsgálati szerelvények (*)	**Retenció (pl. kg/m^3)**
Kezelt „x”	Átlagérték és szórás vagy terjedelem 5 mintadarabra
Kezelt „y”	Átlagérték és szórás vagy terjedelem 5 mintadarabra
Kezelt „z”	Átlagérték és szórás vagy terjedelem 5 mintadarabra
Kezeletlen	
A vizsgálati módszer paramétereinek változása	például vízminőség, vizsgálati darabok méretei, stb.

(*) x, y és z a három párhuzamos mintát jelenti

▼M6

Időpont	Vízcsere	Mintadarab tömege		Vízfelvétel		Vízminta				
		Kezelt (átlag)	Kezeletlen	Kezelt (átlag)	Kezeletlen		Vizsgált víz	x	y	z
	Dátum	g	g	g	g	szám	pH	pH	pH	pH
Kezdés										
6 óra						1				
24 óra						2				
2 nap						3				
4 nap						4				
8 nap						5				
15 nap						6				
22 nap						7				
29 nap						8				

▼M6

Kérjük, hogy minden hatóanyag esetében külön táblázatot készítsen

Időpont	Vízcsere	Analitikai eredmények															
		Kezeletlen mintadarabok			Kezelt mintadarabok												
		Hatóanyag-koncentráció a vízben mg/l	Kibocsátott mennyiség mg/m^2	Kibocsátási ráta $mg/m^2/d$	Hatóanyag-koncentráció a vízben				Kibocsátott mennyiség				Kibocsátási ráta			
					x	y	z	Átlag	x	y	z	Átlag	x	y	z	Átlag
	Dátum				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$
6 óra																
24 óra																
2 nap																
4 nap																
8 nap																
15 nap																
22 nap																
29 nap																

Megjegyzések: Mivel a kezeletlen mintadarabok eredményeit esetleg a kezelt mintákból származó kibocsátási értékek korrigálására kell használni, a kezeletlen eredményeket kell először bevinni, és a kezelt minták értékei „korrigált értékek” lesznek. Esetleg a kezdeti vízanalízis korrekciójára is szükség lehet.

02008R0440 — HU — 16.10.2019 — 008.001 — 2400

▼**M6**

2. függelék

Fogalommeghatározások

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Vizsgált vegyi anyag: az e vizsgálati módszerrel vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼M6

C.46. BIOLÓGIAI FELHALMOZÓDÁS ÜLEDÉKLAKÓ BENTIKUS KEVÉSSERTÉJŰEKBEN

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 315. vizsgálati iránymutatásában (2008) leírt módszerrel. Az üledékfogyasztó endobentikus állatok üledékhez kötött anyagoknak lehetnek kitéve (1). Ezek közül az üledékfogyasztó állatok közül a vízi kevéssertéjűek fontos szerepet játszanak a vízi rendszerek alsó részében. Az üledékben élnek és gyakran a legnagyobb abundanciával előforduló fajok közé tartoznak, különösen a más állatok számára kedvezőtlen környezeti feltételekkel rendelkező élőhelyeken. Ezek az állatok az üledék bioturbációja révén és zsákmányállatként nagy hatással vannak az ilyen anyagok más élőlények – például bentivor halak – számára való biológiai elérhetőségére. Az epibentikus organizmusokkal szemben az endobentikus vízi kevéssertéjűek az üledékbe ássák magukat, és az üledék felszíne alatt üledékrészecskéket fogyasztanak. Ezért ezek az organizmusok számos felvételi úton keresztül ki vannak téve különféle anyagoknak, így közvetlen érintkezés, illetve a szennyezett üledékrészecskék, pórusvíz és fedővíz felvétele útján is. A bentikus kevéssertéjűek közé tartozó egyes fajokat, amelyeket az ökotoxikológiai vizsgálatokban jelenleg felhasználnak, a 6. függelék ismerteti.

2. Az anyag biológiai felhalmozódását jellemző paraméterek a bioológiai felhalmozódási tényező (BAF), az üledék felvételi sebességi állandó (k_s) és az ürülési sebességi állandó (k_e). E paraméterek részletes meghatározása az 1. függelékben található.

3. Általánosságban az anyagok biológiai felhalmozódási potenciáljának értékelése, illetve az üledékekbe vagy üledékekre történő megoszlásra hajlamos anyagok biológiai felhalmozódásának vizsgálata kompartmentspecifikus vizsgálati módszert igényel (1) (2) (3) (4).

4. E vizsgálati módszer célja az üledékhez kapcsolódó anyagok biológiai felhalmozódásának értékelése endobentikus kevéssertéjű férgekben. A vizsgált anyagot szennyezésként bevisszük az üledékbe. Az így elszennyezett üledék hivatott szimulálni a szennyezett üledéket.

5. Ez a módszer a meglévő üledéktoxicitási és biológiai felhalmozódási vizsgálati módszereken alapul (1) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Egyéb hasznos dokumentumok: nemzetközi workshop megbeszélései és eredményei (11), valamint egy nemzetközi körvizsgálat eredményei (12).

6. A vizsgálat az üledékekhez való kapcsolódásra hajlamos stabil, semleges szerves anyagokra alkalmazható. A módszerrel az üledékekhez kapcsolódó, stabil fémorganikus vegyületek biológiai felhalmozódását is mérni lehet (12). A módszer nem alkalmazható fémekre és egyéb nyomelemekre a vizsgálati terv – a szubsztrátumot és a vízmennyiséget, valamint esetleg a szövetiminta méretét érintő – módosítása nélkül (11).

ELŐFELTÉTELEK ÉS A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

7. A biológiai felhalmozódási folyamatokkal kapcsolatban csak néhány jól megalapozott mennyiségi szerkezet-aktivitás összefüggés (Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR) áll jelenleg rendelkezésre (14). Legelterjedtebben a stabil szerves anyagok biológiai felhalmozódása és biokoncentrációja, illetve lipofilitása közötti összefüggést használják (ez utóbbi mennyiséget az oktanol-víz megoszlási hányados logaritmusaként kifejezve [log K_{ow}]; a fogalom meghatározását lásd az 1. mellékletben), amely egy anyag víz és halak közötti megoszlásának leírására lett kifejlesztve. Ezen

▼M6

összefüggés felhasználásával az üledék kompartment vonatkozásában is megalapoztak már korrelációkat (15) (16) (17) (18). A log K_{ow}–log BCF korreláció – mint jelentős QSAR – hasznos lehet az üledékhez kapcsolódó anyagok biológiai felhalmozódási potenciáljának első előzetes becslésére. A BAF-ot azonban befolyásolhatja a vizsgálati organizmus lipidtartalma és az üledék szervesszén-tartalma. Ezért a szerves szén-víz megoszlási hányadost (K_{oc}) is lehet az üledékhez kapcsolódó szerves anyagok biológiai felhalmozódásának fő meghatározójaként használni.

8. Ez a vizsgálat a következőkre alkalmazható:

— stabil, szerves anyagok, amelyek log K_{ow}-értéke 3,0 és 6,0 közötti (5) (19), valamint szuperlipofil anyagok, amelyek 6,0 feletti log K_{ow}-értéket mutatnak (5);

— olyan anyagok, amelyek az élő szervezetekben ismert biológiai felhalmozódási potenciált mutató szerves anyagok csoportjába tartoznak, pl. felületaktív anyagok vagy nagymértékben adszorbeáló anyagok (pl. magas K_{oc}).

9. A vizsgálat megkezdése előtt össze kell gyűjteni a vizsgált anyagra vonatkozó információkat, például a biztonsági előírásokat, a megfelelő tárolási körülményeket és az analitikai módszereket. A (20) és a (21) szakirodalom iránymutatást ad a fizikai-kémiai jellegzetességeiknél fogva nehezen vizsgálható anyagok vizsgálatához. A vízi kevéssertéjűekkel végzett biológiai felhalmozódási vizsgálat végrehajtása előtt ismerni kell az alábbi információkat:

— közönséges név, kémiai név (lehetőleg az IUPAC név), szerkezeti képlet, CAS nyilvántartási szám, tisztaság;

— vízoldhatóság [A.6. vizsgálati módszer (22)];

— oktanol-víz megoszlási hányados, K_{ow} [A.8. és A.24. vizsgálati módszer (22)];

— üledék-víz megoszlási hányados, K_d vagy K_{oc} formájában kifejezve [C.19. vizsgálati módszer (22)];

— hidrolízis [C.7. vizsgálati módszer] (22);

— fototranszformáció vízben (23);

— gőznyomás [A.4. vizsgálati módszer (22)];

— gyors biológiai lebonthatóság [C.4. és C.29. vizsgálati módszer (22)];

— felületi feszültség [A.5. vizsgálati módszer (22)];

— kritikus micellakoncentráció (24).

Ezenkívül – ha rendelkezésre állnak – a következő adatok lehetnek lényegesek:

— biológiai lebomlás vízi környezetben [C.24. és C.25. vizsgálati módszer (22)];

— Henry-állandó.

10. A radioaktív izotóppal jelölt vizsgált anyagok megkönnyíthetik a víz, az üledékek és a biológiai minták elemzését, és annak eldöntésére is felhasználhatók, hogy szükség van-e a lebomlási termékek azonosítására és mennyiségi meghatározására. Az itt leírt módszert nemzetközi körvizsgálatban validálták (12) a ^{14}C-vel jelölt anyagok tekintetében. Amennyiben az összes radioaktív maradékot megmérjük, a biológiai felhalmozódási tényező (BAF) a kiindulási anyagon alapul, beleértve a visszatartott bomlástermékeket is. Lehetőség van a metabolizmus vizsgálatok és a biológiai felhalmozódási vizsgálatok összekapcsolására is a kiindulási anyag és bomlástermékeinek a felvételi fázis végén vagy a biológiai felhalmozódás legmagasabb

▼M6

szintje mellett vett mintákban történő elemzése és százalékos számszerűsítése útján. Ajánlott, hogy a BAF-számítás a kiindulási anyag organizmusokban lévő koncentrációján alapuljon, és ne az összes radioaktív maradványon.

11. A vizsgált anyag tulajdonságai mellett szükség van a vizsgálat során használandó kevéssertéjű fajjal szembeni toxicitásra vonatkozó információra is (például a felvételi fázishoz szükséges időtartamra vonatkozó közepes letális koncentráció (LC_{50})) annak érdekében, hogy a kiválasztott expozíciós koncentrációk sokkal alacsonyabbak legyenek, mint a toxikus szintek. Lehetőség szerint a szubletális végpontokkal végzett hosszú távú vizsgálatokból származó toxicitási értékeket (EC_{50}) kell alkalmazni. Ha ilyen adatok nem állnak rendelkezésre, a biológiai felhalmozódási vizsgálat feltételeivel megegyező feltételek mellett végzett akut toxicitási vizsgálat, vagy a helyettesítő fajokra vonatkozó toxicitási adatok hasznos információval szolgálhatnak.

12. Rendelkezni kell egy ismert pontosságú, precizitású és érzékenységű megfelelő analitikai módszerrel az anyag vizsgálathoz használt oldatokban, üledékben és biológiai anyagokban való mennyiségi meghatározására, valamint a minták előkészítésére és tárolására vonatkozó részletes eljárásokkal, illetve az anyagok biztonsági adatlapjaival. Ismerni kell a vizsgált anyag analitikai kimutathatósági határát vízben, üledékben és féregszövetekben. Radioaktív izotóppal jelölt vizsgált anyag használata esetén ismerni kell a fajlagos radioaktivitást (Bq/mol), a radioaktív izotóppal jelölt atom helyzetét, illetve a szennyeződésekhez kapcsolódó radioaktivitás százalékos arányát is. A lehető legalacsonyabb vizsgálati koncentrációk kimutatása érdekében a vizsgált anyag fajlagos radioaktivitásának a lehető legmagasabbnak kell lennie (11).

13. Rendelkezésre kell állnia a használandó üledék jellemzőinek (pl. az üledék vagy összetevőinek eredete, a pórusvíz (terepi üledék) pH-ja és ammóniakoncentrációja, szerves széntartalom (TOC), szemcseméret-eloszlás [a homok, iszap és agyag százalékos aránya], száraztömeg-százalék) (6).

A VIZSGÁLAT ELVE

14. A vizsgálat két fázisból áll: a felvételi (expozíciós) fázisból és az ürülési (expozíció utáni) fázisból. A felvételi fázis alatt a férgeket a vizsgált anyaggal szennyezett, mesterséges vízzel feltöltött és megfelelő módon egyensúlyba került üledéknek tesszük ki (11). A kontroll férgek csoportjait azonos körülmények között tartjuk, de a vizsgált anyag nélkül.

15. Az ürülési fázishoz a férgeket áthelyezzük egy vizsgált anyagtól mentes üledék-víz rendszerbe. Az ürülési fázisra azért van szükség, hogy információt lehessen szerezni a vizsgált anyagnak a vizsgálati organizmusokból való kiürülési sebességről (19) (25). Az ürülési fázis csak akkor hagyható el, ha a vizsgált anyag felvétele az expozíciós fázis alatt elhanyagolható mértékű volt (pl. nincs statisztikai különbség a vizsgált anyagnak a vizsgálati és kontroll férgekben mért koncentrációja között). Ha az állandósult állapotot a felvételi fázis alatt nem értük el, a kinetika (BAF_k, felvételi és ürülési konstans(ok)) meghatározása az ürülési fázis eredményeinek felhasználásával is történhet. A vizsgált anyag koncentrációjának változását a férgekben/férgeken a vizsgálat mindkét fázisa során mindvégig figyelemmel kell kísérni.

16. A felvételi fázis alatt mindaddig méréseket végzünk, amíg a BAF eléri a platót vagy az állandósult állapotot. Alapértelmezésben a felvételi fázis 28 napig tart. A gyakorlati tapasztalat azt mutatja, hogy a 12–14 napos felvételi fázis több stabil, semleges szerves anyag esetében is elegendő az állandósult állapot eléréséhez (6) (8) (9).

▼M6

17. Ha azonban 28 napon belül nem érjük el az állandósult állapotot, elindítjuk az ürülési fázist a szennyezésnek kitett kevéssertéjűeket olyan edényekbe áthelyezve, amelyek ugyanazt a közeget tartalmazzák, de a vizsgált anyag nélkül. Az ürülési fázis akkor ér véget, amikor a férgekben elérjük a felvételi fázis 28. napján mért koncentráció 10 %-os szintjét, vagy egy 10 napos maximális időtartam elteltével. A férgekben az ürülési fázis végén mért maradványszintet kiegészítő végpontként kell jegyzőkönyvezni, pl. nem kiválasztott maradványokként (non-eliminated residues, NER). A biológiai felhalmozódási tényezőt (BAF_{ss}) lehetőleg a férgekben (C_a) és az üledékben (C_s) láthatóan állandósult állapotban mért koncentrációk hányadosaként, illetve kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőként (BAF_K) (az üledék felvételi sebességi állandó (k_s) és az ürülési sebességi állandó (k_e) hányadosa, elsőrendű kinetikát feltételezve) is ki kell számítani. Ha az állandósult állapotot nem érjük el 28 napon belül, a BAF_K értékét a felvételi és az ürülési sebességi állandó(k)ból kell kiszámítani. A számítást lásd a 2. függelékben. Ha nem alkalmazható az elsőrendű kinetika, összetettebb modelleket kell használni (2. függelék és (25) szakirodalom).

18. Ha az állandósult állapot nem érhető el 28 napon belül, a felvételi fázis választhatóan meghosszabbítható a kitett férgek csoportjait – ha vannak – a további méréseknek alávetve mindaddig, amíg az állandósult állapotot elérik; ezzel párhuzamosan az ürülési fázist a felvételi fázis 28. napján azonban meg kell kezdeni.

19. A felvételi sebességi állandót, az ürülési sebességi állandót (vagy komplexebb modellek használata esetén állandókat), a kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőt (BAF_K) és – amennyiben lehetséges – e paraméterek mindegyike esetében a konfidenciaintervallumot számítógépes módszerrel, modellegyenletekből kell kiszámítani (az útmutatást lásd a 2. függelékben). Bármely modell esetében az illeszkedés megfelelősége meghatározható például a korrelációs együttható vagy a determinációs együttható alapján (az együttható 1-hez közeli értéke jelzi a jó illeszkedést).

20. Magas lipofilitású szerves anyagok esetében a vizsgálati eredmények variabilitásának csökkentése érdekében a biológiai felhalmozódási tényezőket ezen kívül a vizsgált organizmusok lipidtartalmához és az üledék szerves-szén-tartalmához (TOC) viszonyítva is ki kell fejezni (bióta-üledék felhalmozódási tényező vagy BSAF, kg üledék TOC/kg féreg lipidtartalom). Ez a megközelítés a vízi kompartmentre vonatkozó tapasztalatokon és elméleti összefüggéseken alapul, ahol – egyes kémiai osztályok esetén – egyértelmű összefüggés áll fenn az anyagok biológiai felhalmozódási potenciálja és lipofilitása között, amely már jól megalapozott a halak, mint modellszervezetek esetében (14) (25) (27). Kapcsolat áll fenn a vizsgálati halak lipidtartalma és az ilyen anyagok megfigyelt biológiai felhalmozódása között is. Bentikus organizmusok esetében is hasonló korrelációt állapítottak meg (15) (16) (17) (18). Ha elegendő féregszövet áll rendelkezésre, akkor a vizsgálati állatok lipidtartalmát ugyanabból a biológiai anyagból lehet meghatározni, mint amelyet a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározására is használunk. Célszerű azonban legalább a felvételi fázis kezdetén vagy – lehetőleg – a végén akklimatizált kontroll állatokat használni a lipid tartalom mérésére, amelyet azután a BAF-értékek normalizálására lehet használni.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

21. A vizsgálat érvényességéhez a következő feltételeknek kell teljesülniük:

— A férgek kumulatív mortalitása (kontrollok és kezelések) a vizsgálat végéig nem haladhatja meg az eredeti szám 20 %-át.

— Bizonyítani kell továbbá, hogy a férgek beássák magukat az üledékbe, ami lehetővé teszi a maximális expozíciót. A részleteket lásd a 28. pontban.

▼M6

A MÓDSZER LEÍRÁSA

A vizsgálathoz használt fajok

22. A vízi kevéssertéjűek több faját lehet használni a vizsgálathoz. A leggyakrabban használt fajok jegyzéke a 6. függelékben található.

23. Rendszeres időközönként (pl. minden hónapban) toxicitási vizsgálatot (96 óra, csak vízben) kell végezni egy toxikus referenciaanyaggal, például kálium-kloriddal (KCl) vagy réz-szulfáttal ($CuSO_4$) (1) a vizsgálati állatok egészségi állapotának igazolása céljából (1) (6). Ha rendszeres időközönkénti referencia toxicitási vizsgálatokat nem végzünk, az organizmusok üledék biológiai felhalmozódási vizsgálatban használandó tételét toxikus referenciaanyaggal kell ellenőrizni. A lipidtartalom mérése szintén hasznos információkkal szolgálhat az állatok állapota tekintetében.

A vizsgálathoz használt organizmusok tenyésztése

24. Annak érdekében, hogy elegendő számú féreg álljon rendelkezésre a biológiai felhalmozódási vizsgálatok lefolytatására, a férgeket egyetlen fajt tartalmazó állandó laboratóriumi tenyészetben kell tartani. A kiválasztott fajok laboratóriumi tenyésztési módszereit a 6. függelék összegzi. A részleteket lásd a (8) (9) (10) (18) (28) (29) (30) (31) (32) szakirodalmi hivatkozásban.

Készülékek

25. A berendezés valamennyi részét illetően kerülni kell az olyan anyagok használatát, amelyek oldódhatnak, amelyek abszorbeálhatják a vizsgált anyagot, amelyek révén más anyagok mosódhatnak ki, valamint amelyek ártalmasak lehetnek a vizsgálathoz használt állatokra. Szabványos, kémiailag inert anyagból készült, a terhelés mértékének – vagyis a kísérleti állatok számának – megfelelő térfogatú négyszögletes vagy hengeres kamrák használhatók. Kerülni kell a puha műanyag csövek használatát a víz vagy levegő adagolásához. A vizsgálati közeggel érintkező berendezésekben politetrafluoretilént, rozsdamentes acélt és/vagy üveget kell használni. Magas adszorpciós együtthatóval rendelkező anyagok – például szintetikus piretroidok – vizsgálata esetén szilanizált üveg használata lehet szükséges. Ilyenkor a felszerelést használat után meg kell semmisíteni (5). A radioaktív izotóppal jelölt vizsgált anyagok és az illékony anyagok esetében ügyelni kell arra, hogy elkerüljük a kihajtást és a kihajtott vizsgált anyag kijutását. Megfelelő abszorbenst tartalmazó csapdákat (pl. üveg gázmosó palackokat) kell használni a vizsgálati kamrákból elpárolgó maradványok visszatartására (11).

Víz

26. A fedővíz minőségének lehetővé kell tennie a vizsgálati fajok túlélését az akklimatizációs és a kísérleti időszakok alatt anélkül, hogy bármilyen rendellenes külső megjelenés vagy viselkedés jelentkezne. A vizsgálatokban, valamint a férgek laboratóriumi tenyészeteiben fedővízként a C.1. vizsgálati módszer szerinti mesterséges víz (25) használata ajánlott. Kimutatták, hogy ebben a vízben számos vizsgálati faj képes túlélni, növekedni és szaporodni (8), és biztosított vizsgálati és tenyésztési körülmények maximális szabványosítása. A vizet legalább a pH-val, a vezetőképességgel és a keménységgel kell jellemezni. A vízben található mikroszennyező anyagok felhasználás előtti analízise hasznos információkat nyújthat (4. függelék).

27. A vizsgálati időszak alatt a víznek állandó minőségűnek kell lennie. A fedővíz pH-értékének az egész vizsgálat során 6 és 9 között kell lennie. Az összes keménységnek a vizsgálat kezdetén 90 és 400 mg $CaCO_3$/liter között kell lennie (7). Az említett mesterséges víz pH- és keménységtartományait a C.1. vizsgálati módszer adja meg (25). Ha a keménységet okozó

▼M6

ionok és a vizsgált anyag közötti kölcsönhatás gyanúja áll fenn, lágyabb vizet kell használni. A 4. függelék összefoglalja az elfogadható hígítóvíznek az OECD 210. vizsgálati iránymutatása szerinti további kritériumait (34).

Üledék

28. A vizsgálathoz olyan minőségű üledéket kell használni, amely lehetővé teszi a vizsgálathoz használt organizmusok túlélését és lehetőség szerinti szaporodását az akklimatizációs és a vizsgálati időszakok alatt anélkül, hogy rendellenes megjelenést vagy viselkedést mutatnának. A férgeknek be kell ásniuk magukat az üledékbe. A beásási viselkedés jelentős hatást gyakorolhat az expozícióra és ennek következtében a BAF-értékre. Ezért a vizsgálati organizmusok üledékkerülő vagy beásási viselkedését fel kell jegyezni, ha a fedővíz zavarossága lehetővé teszi az ilyen megfigyeléseket. A férgeknek (kontroll és kezelések) a vizsgálati edényekbe történő behelyezést követő 24 órán belül be kell ásniuk magukat az üledékbe. Ha állandósult beásási hiba vagy az üledék elkerülése figyelhető meg (pl. a férgek több mint 20 %-ánál a felvételi fázis több mint felén át), az azt jelzi, hogy a vizsgálati körülmények nem megfelelőek, vagy a vizsgálati organizmusok nem egészségesek, vagy a vizsgált anyag koncentrációja váltja ki ezt a viselkedést. Ilyen esetben a vizsgálatot le kell állítani, és jobb körülmények között megismételni. Az üledékfogyasztásra vonatkozó további információk nyerhetők a (35) és (36) szakirodalmi hivatkozásban leírt módszerek alkalmazásával, amelyek meghatározzák az üledékfogyasztást és a részecskék kiválasztását a vizsgálati organizmusokban. Amennyiben megfigyelhető, fel kell jegyezni legalább az üledék férgek általi elfogyasztását jelző székletpelletek jelenlétét vagy hiányát az üledék felszínén, és ezt a vizsgálati eredmények értelmezése során az expozíciós útvonalak tekintetében figyelembe kell venni.

29. A vizsgálatokban és a férgek laboratóriumi tenyészeteiben (5. függelék) a C.8. vizsgálati módszerben leírt mesterséges talajon alapuló mesterséges üledék (40) használata ajánlott, mivel a megfelelő minőségű természetes üledékek nem állnak rendelkezésre egész évben. Ezenkívül a természetes üledékekben eleve jelen lévő mikroorganizmusok, valamint a lehetséges mikroszennyezők is befolyásolhatják a vizsgálatot. A mesterséges üledékben több vizsgált faj is képes túlélni, fejlődni és szaporodni (8).

30. A mesterséges üledéket legalább az összetevők eredetével, a szemcseméret eloszlásával (homok, iszap és agyag százalékos aránya), az összes szerves széntartalommal (TOC), a víztartalommal és a pH-val kell jellemezni. A redox potenciál mérése választható. Nem szennyezett területekről származó természetes üledékek is szolgálhatnak azonban vizsgálati és/vagy tenyésztő üledékként (1). A természetes üledékeket legalább az eredettel (gyűjtőhely), a pórusvíz pH-jával és ammóniatartalmával, a szerves széntartalommal (TOC), a szemcseméret-eloszlással (homok, iszap és agyag százalékos aránya), valamint a százalékos víztartalommal kell jellemezni (6). Ha ammónia képződésére lehet számítani, a vizsgált anyaggal való szennyezés előtt ajánlott a természetes üledéket – az elkövetkező vizsgálat során uralkodóval megegyező körülmények között – hét napig kondicionálni. E kondicionálási időszak végén a fedővizet el kell távolítani és ki kell önteni. Az üledékben, illetve az összetevőiben található mikroszennyező anyagok analízise a felhasználás előtt hasznos információkat szolgáltathat.

Elkészítés

31. A természetes üledékek használat előtti kezelését a laboratóriumban az (1), (6) és (44) szakirodalom írja le. A mesterséges üledék elkészítését a 5. függelék mutatja be.

▼M6

Tárolás

32. A természetes üledékek tárolása a laboratóriumban a lehető legrövidebb időtartamú legyen. Az US EPA (6) a tárolás maximális időtartamának a 8 hetet javasolja 4 ± 2 °C-on és sötétben. A tárolótartályokban nem lehet fejtér az üledék felett. A mesterséges üledék tárolására vonatkozó ajánlások az 5. függelékben találhatók.

A vizsgált anyag bevitele

33. Az üledéket beszennyezzük a vizsgált anyaggal. A szennyezési eljárás magában foglalja egy vagy több üledékösszetevő vizsgált anyaggal való bevonását. Például a kvarchomokot, vagy annak egy részét (pl. vizsgálati edényenként 10 g kvarchomokot) át lehet itatni a vizsgált anyag megfelelő oldószerrel elkészített oldatával, amely azután elpárolog. Ezt követően a bevont részt össze lehet keverni a nedves üledékkel. Az üledék elkészítése során a vizsgált anyag és a homok keverékéből származó homokot is figyelembe kell venni, azaz az üledéket kevesebb homokkal kell készíteni (6).

34. Természetes üledék esetében a vizsgált anyagot úgy is be lehet vinni, hogy az üledék egy kiszárított részét szennyezzük be a mesterséges üledék kapcsán fentebb leírtak szerint, vagy a vizsgált anyagot elkeverjük a nedves üledékben és a használt oldódást segítő szert utólag elpárologtatjuk. A nedves üledék szennyezésére felhasználható oldószerek: etanol, metanol, etilén-glikol-metil-éter, etilénglikol-dimetil-éter, dimetil-formamid és trietilén-glikol (5) (34). A megfelelő oldódást segítő szer kiválasztásakor az oldószer toxicitása és illékonysága, illetve a vizsgált anyagnak a kiválasztott oldószerben való oldhatósága legyen a fő kritérium. A szennyezési eljárásokra vonatkozó további útmutatást az Environment Canada (1995) szolgáltat (41). Biztosítani kell az üledékhez adott vizsgált anyag egyenletes eloszlását az üledékben. Analizálni kell a szennyezett üledék párhuzamos részmintáit a vizsgált anyag üledékben lévő koncentrációjának ellenőrzése céljából, illetve hogy meghatározzuk a vizsgált anyag eloszlásának homogenitását.

35. A vízzel fedett szennyezett üledék előállítását követően hagyni kell, hogy a vizsgált anyag eloszoljon az üledék és a vízfázis között. Ez lehetőleg a vizsgálat során alkalmazottal megegyező hőmérsékleti és levegőztetési viszonyok mellett történjen. A kiegyensúlyozódási időszak üledék- és anyagspecifikus, tartama óráktól napokig terjedhet, de ritka esetekben több (4–5) hetet is igénybe vehet (28) (42). Ebben a vizsgálatban az egyensúly beálltát nem kell megvárni, hanem egy 48 óra és 7 nap közötti hosszúságú kiegyensúlyodózási időszak használata ajánlott. A vizsgálat céljától függően (pl. ha a környezeti feltételeket kell utánozni) a szennyezett üledéket hosszabb ideig lehet hagyni, hogy közelítse az egyensúlyi állapotot, illetőleg hogy érjen.

A VIZSGÁLAT ELVÉGZÉSE

Előzetes vizsgálat

36. Hasznos lehet elővizsgálatot végezni a meghatározó vizsgálat körülményeinek optimalizása céljából, pl. a vizsgált anyag koncentrációjának és a felvételi és ürülési fázisok időtartamának megválasztása érdekében. Az előzetes vizsgálat során meg kell figyelni és fel kell jegyezni a férgek viselkedését,

▼M6

például az üledék elkerülését (amikor a férgek elmenekülnek az üledékből), amit a vizsgált anyag és/vagy maga az üledék okozhat. Az előzetes vizsgálat során az üledék elkerülését szubletális paraméterként is lehet használni a vizsgált anyag biológiai felhalmozódási vizsgálatban használandó koncentrációjának/koncentrációinak becslésére.

Expozíciós körülmények

A felvételi fázis időtartama

37. A vizsgálathoz használt organizmusokat a felvételi fázisban tesszük ki a vizsgált anyagnak. Az első mintát 4–24 órával a felvételi fázis kezdete után kell venni. A felvételi fázis legfeljebb 28 napig tart (1) (6) (11), kivéve ha igazolható, hogy az egyensúly korábban beállt. Az állandósult állapot akkor jelentkezik, ha: (i) az egyes mintavételi időszakokra vonatkozó és az idő függvényében ábrázolt biológiai felhalmozódási tényezők görbéje párhuzamos az időtengellyel; (ii) a BAF legalább kétnapos időközönként vett mintákon végzett három egymást követő elemzése nem tér el ± 20 %-ot meghaladó mértékben egymástól; és (iii) a három mintavételi időszak között nincsenek szignifikáns különbségek (statisztikai összehasonlítás alapján, pl. varianciaanalízis és regresszióanalízis). Amennyiben az állandósult állapot nem áll be 28 napon belül, a felvételi fázist az ürülési fázis megkezdésével be lehet fejezni, és a BAF_K értékét a felvételi és ürülési sebességi állandókból lehet kiszámítani (lásd még a 16. és 18. pontot).

Az ürülési fázis időtartama

38. Az első mintát 4–24 órával az ürülési fázis megkezdése után kell venni, mivel a kezdeti időszakban gyors változások következhetnek be a szöveti maradványokban. Az ürülési fázist akkor javasolt befejezni, amikor a vizsgált anyag koncentrációja az egyensúlyi koncentráció legfeljebb 10 %-a, vagy egy 10 napos maximális időtartam után. A férgekben az ürülési fázis végén mért maradványszintet másodlagos végpontként kell jegyzőkönyvezni. Az időtartamot azonban az a periódus is megszabhatja, amely alatt a férgekben a vizsgált anyag koncentrációja az analitikai kimutathatósági határérték fölött marad.

A vizsgálathoz használt organizmusok

A vizsgálathoz használt férgek száma

39. A férgek mintánkénti számának egy olyan féregszövet-tömeget kell biztosítania, hogy a vizsgált anyag mintánkénti tömege a felvételi fázis elején és az ürülési fázis végén lényegesen magasabb legyen, mint a vizsgált anyag kimutathatósági határa biológiai anyagokban. A felvételi és ürülési fázis említett szakaszaiban a koncentráció a vizsgálati állatokban rendszerint viszonylag alacsony (6) (8) (18). Mivel a vízi kevéssertéjűek számos faja esetén az egyes példányok tömege nagyon alacsony (5–10 mg nedves tömeg példányonként a *Lumbriculus variegatus* és a *Tubifex tubifex* esetén), az egy vizsgálati kamrában lévő férgeket a tömegmérés és kémiai analízis céljára össze lehet vonni. A magasabb egyedi tömeggel rendelkező vizsgálati fajok (pl. *Branchiura sowerbyi*) esetén egy példányt tartalmazó ismétléseket is lehet használni, de ilyen esetben az ismétlések számát mintavételi pontonként ötre kell emelni (11). Meg kell azonban jegyezni, hogy a *B. sowerbyi* fajt nem vonták be a körvizsgálatba (12), és ezért nem szerepel a módszerben előnyben részesítendő fajok között.

40. Hasonló méretű férgeket kell választani (az *L. variegatus* esetében lásd a 6. pontot). A férgek ugyanabból a forrásból származzanak, és azonos korosztályú, felnőtt és nagytestű állatok legyenek (lásd a 6. függeléket). Az állat tömege és kora jelentős hatással lehet a BAF-értékekre (pl. az eltérő lipidtartalom és/vagy a peték jelenléte miatt); ezeket a paramétereket pontosan fel kell jegyezni. Az átlagos nedves és száraz tömeg mérése céljából a vizsgálat megkezdése előtt meg kell mérni a férgek egy részmintáját.

▼M6

41. A *Tubifex tubifex* és a *Lumbriculus variegatus* esetében szaporodás várható a vizsgálati időszak alatt. A biológiai felhalmozódási vizsgálat alatti szaporodás hiányát fel kell jegyezni, és figyelembe kell venni a vizsgálati eredmények értelmezése során.

Betelepítés

42. Nagy üledék/féreg és víz/féreg arányokat kell használni, hogy minimálizálható legyen a vizsgált anyag üledékkoncentrációjának csökkenése a felvételi fázisban, illetve hogy elkerülhető legyen az oldott oxigén koncentrációjának csökkenése. A kiválasztott betelepítési aránynak a kiválasztott faj természetben előforduló populációsűrűségének is meg kell felelnie (43). Például a *Tubifex tubifex* esetében 1–4 mg féregszövet betelepítési arány (nedves tömeg) ajánlott a nedves üledék egy grammjára vetítve (8) (11). Az (1) és (6) szakirodalom ≤ 1 g féregszövet száraz tömeg betelepítési arányt ajánl *L. variegatus* esetében 50 g üledékbeli szerves széntartalomra vetítve.

43. A vizsgálatban használandó férgeket a tenyésztőüledék szitálásával távolítjuk el a tenyészetből. Az állatokat (közelmúltban lezajlott fragmentáció jeleit nem mutató felnőtt vagy nagy férgeket) tiszta vizet tartalmazó üvegedényekbe (pl. Petri-csészékbe) helyezzük át. Ha a vizsgálati feltételek eltérnek a tenyésztési körülményektől, akkor 24 órás akklimatizációs szakaszra van szükség. Mérés előtt a felesleges vizet el kell távolítani a férgekről. Ez úgy történhet, hogy a férgeket óvatosan egy előnedvesített papírkendőre helyezzük. Nem ajánlott nedvszívó papírt használni a férgek szárítására, mert stresszt okozhat vagy károsíthatja a férgeket. Brunson és munkatársai (1998) a kívánt élőanyag-tömeg 1,33-szorosának megfelelő nem letörölgetett féreg használatát javasolják. A többlet 33 % a letörölgetett és a nem letörölgetett férgek közötti különbségnek felel meg (28).

44. A felvételi fázis elején (a vizsgálat 0. napján) a vizsgálati organizmusokat eltávolítjuk az akklimatizációs kamrából, és véletlenszerűen szétosztjuk a mesterséges vizet tartalmazó edények (pl. Petri-csészék) között úgy, hogy minden edényhez két féregből álló csoportokat adunk hozzá, amíg minden edény tíz férget nem tartalmaz. Ezután a féregcsoportokat véletlenszerűen áthelyezzük külön vizsgálati edényekbe, pl. lágyacél csipesszel. Ezt követően a vizsgálati edényeket vizsgálati körülmények között inkubáljuk.

Táplálás

45. Tekintettel a mesterséges üledék alacsony tápanyagtartalmára, az üledéket táplálékforrással kell kiegészíteni. Annak érdekében, hogy ne becsüljük alá a vizsgálati organizmusok expozícióját (pl. nem szennyezett táplálék szelektív etetésével), a vizsgált organizmusok szaporodásához és növekedéséhez szükséges táplálékot egyszerre kell hozzáadni az üledékhez a vizsgált anyag alkalmazása előtt vagy az alkalmazás során (lásd az 5. függeléket).

Üledék-víz arány

46. Az ajánlott üledék-víz arány 1:4 (45). Ezt az arányt megfelelőnek tekintik az oxigénkoncentráció megfelelő szinten tartásához, illetve az ammónia fedővízben történő felhalmozódásának elkerüléséhez. A fedővíz oxigéntartalmát a telítettség ≥ 40 %-án kell tartani. A vizsgálati edények fedővizét óvatosan levegőztetni kell (pl. 2–4 buborék másodpercenként) egy Pasteur-pipettán keresztül, amelyet kb. 2 cm-rel az üledékfelszín felett kell elhelyezni, hogy minimalizáljuk az üledék felkavarodását.

▼M6

Fény és hőmérséklet

47. A tenyészetben és a vizsgálatban a megvilágítási időszak általában 16 óra (1) (6). A vizsgálati területen mintegy 500–1 000 lux megvilágítást kell fenntartani. A vizsgálat teljes időszaka alatt 20 ± 2 °C hőmérsékletet kell biztosítani.

Vizsgálati koncentrációk

48. Egyetlen vizsgálati koncentrációt (a lehető legalacsonyabbat) használunk a felvétel kinetika meghatározására, de egy második (magasabb) koncentráció is használható (pl. (46)). Ebben az esetben az állandósult állapotban vagy 28 nap után mintákat veszünk, és az alacsonyabb koncentráción mért BAF megerősítése céljából elemezzük azokat (11). A magasabb koncentrációt úgy kell megválasztani, hogy a káros hatások kizárhatók legyenek (pl. a megfelelő krónikus toxicitási vizsgálatokban kapott EC_x krónikus hatást okozó legkisebb koncentráció körülbelül 1 %-ának kiválasztásával). Az alacsonyabb vizsgálati koncentrációnak jelentős mértékben meg kell haladnia az alkalmazott analitikai módszer kimutathatósági határértékét üledékekben és biológiai mintákban. Ha a vizsgált anyag hatáskoncentrációja közel van az analitikai kimutatási határhoz, radioaktív izotóppal jelölt vizsgált anyag használata ajánlott nagy fajlagos radioaktivitással.

Kezelt és kontroll ismétlések

49. A kinetikai mérésekhez a kezelt ismétlések minimális száma az egész felvételi és ürülési fázis során mintavételi pontonként három legyen (11). További ismétléseket kell alkalmazni például a választható kiegészítő mintavételi dátumokhoz. Az ürülési fázis esetében megegyező számú ismétlést készítünk nem szennyezett üledékkel és fedővízzel, hogy a felvételi fázis végén a kezelt férgeket a kezelt edényekből nem kezelt edényekbe helyezhessük át. A kezelt ismétlések összes számának a felvételi és az ürülési fázishoz egyaránt elegendőnek kell lennie.

50. Alternatív megoldásként az ürülési fázisban történő mintavételre kijelölt férgeket egy olyan nagy tartályban is ki lehet tenni a vizsgált anyagnak, amely a felvételi kinetika során használttal megegyező tételből származó szennyezett üledéket tartalmaz. Bizonyítani kell, hogy a vizsgálati körülmények (pl. az üledék mélysége, az üledék-víz arány, a betelepítés, a hőmérséklet, a víz minősége) hasonlóak a felvételi fázishoz kijelölt ismétlések körülményeihez. A felvételi fázis végén víz-, üledék- és féregmintákat kell venni ebből a tartályból analízis céljára, és elegendő számú, a közelmúltban bekövetkezett fragmentáció jeleit nem mutató nagy férget kell ebből a tartályból óvatosan eltávolítani és áthelyezni az ürülési fázishoz előkészített ismétlésekbe (pl. ismétlésenként tíz férget).

51. Ha oldószert nem, csak vizet használunk, legalább 9 negatív kontroll ismétlést (legalább 3-ból az indításkor, 3-ból a felvétel végén és 3-ból az ürülés végén kell mintát venni) kell biztosítani a biológiai és a háttérelemzés céljára. Ha a vizsgált anyag bevitelére oldódást segítő szert alkalmazunk, egy oldószeres kontrollt is futtatni kell (legalább 3 ismétlésből az indításkor, 3-ból a felvételi fázis végén és 3-ból az ürülési fázis végén kell mintát venni). Ebben az esetben a legalább 4 negatív kontroll ismétlést (oldószer nélkül) kell biztosítani a felvételi fázis végén történő mintavételhez. Ezek az ismétlések az oldószeres kontrollal való biológiai összehasonlításra szolgálnak, amelyből az oldószernek a vizsgálathoz használt organizmusokra gyakorolt lehetséges hatásáról kaphatunk tájékoztatást. Ennek részletei a 3. függelékben szerepelnek.

▼M6

A vízminőség mérésének gyakorisága

52. A fedővízben legalább az alábbi vízminőségi paramétereket kell mérni a felvételi és az ürülési fázis alatt:

Hőmérséklet	minden kezelési szinten mintavételi időpontonként egy edényben, valamint egy kontroll edényben hetente egyszer és a felvételi és az ürülési fázis elején és végén; a környező közeg (környezeti levegő vagy vízfürdő) vagy egy reprezentatív vizsgálati edény hőmérsékletét is fel kell jegyezni, pl. folyamatosan vagy óránként;
Oldott oxigén koncentrációja	minden kezelési szinten egy edényben, valamint mintavételi időpontonként egy kontroll edényben; mg/l-ben és az ASV (levegő telítettségi érték) százalékában kifejezve;
Levegőellátás	legalább naponta egyszer kell ellenőrizni (munkanapokon), és szükség esetén módosítani kell;
pH	minden kezelési szinten mintavételi időpontonként egy edényben, valamint egy kontroll edényben hetente egyszer és a felvételi és az ürülési fázis elején és végén;
A víz összes keménysége	legalább egy kezelt edényben és egy kontroll vizsgálati edényben a felvételi és az ürülési fázis elején és végén, mg $CaCO_3$/l mértékegységben kifejezve;
Összes ammóniatartalom	legalább egy kezelt edényben és egy kontroll vizsgálati edényben a felvételi és az ürülési fázis elején és végén; mg/l NH^{4+} vagy NH_3 vagy összes ammónia-N formában kifejezve.

A féreg, üledék- és vízminták gyűjtése és analízise

Mintavételi ütemterv

53. A 28 napos felvételi fázisra és 10 napos ürülési fázisra vonatkozó mintavételi ütemtervre a 3. függelék mutat be példákat.

54. A vizsgált anyag koncentrációjának a meghatározásához a férgek behelyezése előtt, valamint a felvételi és az ürülési fázis során kell víz- és üledékmintákat venni a vizsgálati edényekből. A vizsgálat alatt meghatározzuk a vizsgált anyag koncentrációját a férgekben, az üledékben, és a vízben, hogy nyomon követhessük a vizsgált anyagnak a vizsgálati rendszer kompartmentjei közötti eloszlását.

55. A felvételi, illetve az ürülési fázis során egyaránt legalább hat alkalommal kell mintát venni a férgekből, az üledékből és a vízből.

56. Addig folytassuk a mintavételt, amíg egy plató (állandósult állapot) nem alakul ki (lásd az 1. függeléket), vagy 28 napig. Ha a platót nem sikerül 28 napon belül elérni, el kell kezdeni az ürülési fázist. Az ürülési fázis elején a kijelölt férgeket kezeletlen üledéket és vizet tartalmazó ismétlésekbe helyezzük át (lásd még a 17. és 18. pontot).

Mintavételezés és a minták előkészítése

57. A vízmintákat dekantálás, kiszívás vagy pipettázás útján vegyük a vizsgált anyag mintában lévő mennyiségének mérésére elegendő térfogatban.

58. A fennmaradó fedővizet óvatosan dekantáljuk vagy kiszívjuk a vizsgálati kamrá(k)ból. Az üledékmintákat óvatosan kell venni, hogy a férgeket csak minimális mértékben zavarjuk.

▼M6

59. A mintavétel időpontjában az összes férget távolítsuk el a vizsgálati ismétlésből, pl. szuszpendáljuk az üledéket a fedővízzel, terítsük szét az ismétlés tartalmát egy lapos tálban, majd szedegessük ki a férgeket egy lágy acélcsipesszel. A férgeket gyorsan öblítsük le vízzel egy lapos üveg- vagy acéltálcán. Távolítsuk el a vízfelesleget. Óvatosan helyezzük át a férgeket egy előzetesen lemért edénybe, és mérjük le a tömegüket. A férgeket fagyasztással (pl ≤ – 18 °C-on) pusztítsuk el. Fel kell jegyezni a bábok és/vagy fiatal egyedek jelenlétét és számát.

60. A férgeket a mintavétel után általában azonnal, a béltartalom ürítése nélkül kell megmérni és elpusztítani, hogy egy konzervatív BAF-értéket kapjunk, amely magában foglalja a szennyezett béltartalmat is, és hogy elkerüljük a testben lévő maradványok elvesztését a csak vízből álló környezetben bekövetkező bélürítési időszak alatt (8). Az 5 feletti log K_{ow} értékkel rendelkező anyagok várhatóan nem ürülnek ki jelentős mértékben a vizes környezetben bekövetkező bélürítési időszakban, míg a 4 alatti log K_{ow}-értékű anyagok számottevő mennyisége elveszhet (47).

61. Az ürülési fázis alatt a tiszta üledékben a férgek kiürítik a béltraktusukat. Ez azt jelenti, hogy a közvetlenül az ürülési fázis előtt végzett mérések még tartalmazzák a szennyezett bélüledéket is, az ürülési fázis kezdeti 4–24 órás időszaka után a szennyezett béltartalom nagyobb része helyébe azonban feltételezhetően már tiszta üledék került (11) (47). Az ebbe a mintába tartozó férgekben mérhető koncentrációt emiatt úgy lehet tekinteni, hogy az a bélürítés utáni szöveti koncentrációval egyezik meg. Annak figyelembevétele érdekében, hogy az ürülési fázisban a vizsgált anyag koncentrációja a nem szennyezett üledék általi hígítás miatt csökkenhet, a béltartalom tömegét a férgek nedves tömegének az elhamvasztott férgek tömegéhez viszonyított aránya, illetve a férgek száraz tömegének az elhamvasztott férgek tömegéhez viszonyított aránya alapján lehet megbecsülni.

62. Ha egy specifikus vizsgálat célja a biológiai hozzáférhetőség és a valódi szöveti maradványok mérése a vizsgált organizmusokban, akkor a kezelt állatok legalább egy – lehetőleg az állandósult állapot alatt gyűjtött – részmintájának (pl. három további ismétlésből) a tömegét meg kell mérni, ezután a béltartalmat tiszta vízben 6 órán keresztül üríteni kell (47), majd részmintát az analízis előtt újból meg kell mérni. E részmintának a férgek tömegére és a testi koncentrációkra vonatkozó adatait ezután össze lehet hasonlítani a bélürítésen át nem esett férgekben kapott értékekkel. Az ürülés mérésére kijelölt férgeket a tiszta üledékre történő áthelyezés előtt nem szabad bélürítésnek alávetni, hogy minimalizáljuk az állatokra gyakorolt stresszt.

63. A vízből, üledékből és férgekből vett mintákat az eltávolítás után lehetőleg azonnal elemezzük (azaz 1–2 napon belül), hogy megakadályozzuk a lebomlást és az egyéb veszteségeket, és hogy a közelítőleges felvételi és ürülési arányokat a vizsgálat előrehaladtával párhuzamosan számíthassuk ki. Az azonnali analízis lehetővé teszi annak kiküszöbölését is, hogy egy platót késve ismerjünk fel.

64. Ha az azonnali analízis nem történik meg, a mintákat megfelelő feltételek mellett kell tárolni. A vizsgálat megkezdése előtt információkat kell szerezni a vizsgált anyag stabilitásáról és megfelelő tárolási körülményeiről (pl. a tárolás időtartama és hőmérséklete, kivonási eljárások, stb.). Ha ilyen információ nem áll rendelkezésre, de azt szükségesnek ítéljük, a tárolási stabilitás meghatározása céljából szennyezett kontroll szöveteket is lehet párhuzamosan futtatni.

Az analitikai módszer minősége

65. Mivel az egész eljárást alapvetően a vizsgált anyaghoz használt analitikai módszer pontossága, precizitása és érzékenysége határozza meg, kísérlettel ellenőrizni kell, hogy a kémiai analízis pontossága és reprodukálhatósága, valamint a vizsgált anyag víz-, üledék- és féregmintákból való visszanyerése

▼M6

kielégítő-e az adott módszerhez. Ellenőrizzük azt is, hogy a vizsgált anyag ne legyen a háttérkoncentrációt meghaladó koncentrációban kimutatható a kontroll kamrákban. Szükség esetén korrigáljuk a C_w-, C_s- és C_a-értékeket a visszanyert értékekkel és a kontrollok háttérértékeivel. A mintákat az egész vizsgálat során olyan módon kezeljük, hogy minimális legyen a szennyezés és a veszteség (pl. a vizsgált anyagnak a mintavételi eszközön való adszorpciója miatt).

66. A teljes visszanyerést, illetve a vizsgált anyag férgekből, üledékből, vízből és – ha alkalmazzuk – az elpárolgott vizsgált anyag visszatartását szolgáló abszorbenseket tartalmazó csapdákból történő visszanyerését fel kell jegyezni és jegyzőkönyvezni kell.

67. Mivel radioaktív izotóppal jelölt anyagok használata ajánlott, lehetőség van a teljes radioaktivitás elemzésére is (azaz a kiindulási és a bomlástermékek együttes elemzésére). Ha azonban analitikusan megoldható, a kiindulási anyag és a bomlástermékek állandósult állapotban vagy a felvételi fázis végén történő számszerűsítése fontos információt nyújthat. Ha ilyen méréseket szándékozunk végezni, a mintákat megfelelő kivonási eljárásoknak kell alávetni, hogy a kiindulási anyagot elkülönítve lehessen mennyiségileg meghatározni. Ha egy észlelt lebomlási termék a vizsgálati organizmusokban az állandósult állapotban vagy a felvételi fázis végén mért radioaktivitás jelentős hányadát (pl. > 10 %) képviseli, ajánlott az ilyen lebomlási termékeket azonosítani (5).

68. Az alacsony egyéni élőanyag-tömeg miatt gyakran nem lehet a vizsgált anyag koncentrációját minden egyes féregben meghatározni, kivéve, ha a Branchiura sowerbyi (40–50 mg nedves tömeg férgenként) fajt használjuk vizsgálati fajként (11). Ezért az adott vizsgálati tartályból mintázott férgek összevonása elfogadható, de ez korlátozza az adatokra alkalmazható statisztikai eljárásokat. Amennyiben a statisztikai eljárás és annak ereje fontos szempont, megfelelő számú kísérleti állatot és/vagy párhuzamos edényt kell bevonni a vizsgálatba, hogy megfeleljünk a kívánt összevonásnak, illetve statisztikai eljárásnak és erőnek.

69. A BAF értékét ajánlott a teljes nedves tömeg, a teljes száraz tömeg és – ha szükséges (pl. erősen lipofil anyagok esetében) – a lipidtartalom és az üledék TOC-értéke függvényében is kifejezni. A lipidtartalom meghatározására megfelelő módszereket kell használni (48) (49). Szabványmódszerként a kloroform/metanol extrakciós technika (50) ajánlott (48). A klórozott oldószerek használata azonban kerülendő, ezért a Bligh- és Dyer-féle módszer (50) körvizsgálatban ellenőrzött és a szakirodalomban (51) leírt módosítását kell alkalmazni. Mivel a különböző módszerek eltérő értékeket eredményeznek (48), az alkalmazott módszert részletesen ismertetni kell. Amennyiben lehetséges, vagyis ha elegendő féregszövet áll rendelkezésre, akkor a lipidtartalom mérését a vizsgált anyag analíziséhez vett mintán vagy extraktumon kell elvégezni, mivel a lipideket a kromatográfiás módszerrel történő analizálás előtt gyakran el kell távolítani az extraktumból (5). Célszerű azonban legalább a felvételi fázis kezdetén vagy – lehetőleg – a végén akklimatizálódott kontrollállatokat használni a lipidtartalom mérésére, pl. három mintában.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények kezelése

70. A vizsgált anyag felvételi görbéjét úgy kapjuk meg, hogy a vizsgált anyagnak a felvételi fázis alatt a férgekben/férgeken mért koncentrációit aritmetikus skálán

▼M6

ábrázoljuk az idő függvényében. Ha a görbe elérte a platót, kiszámítjuk az állandósult állapot BAF_{ss}-értékét:

$$\frac{C_a \text{az állandósult állapotban vagy a 28. napon (átlag)}}{C_s \text{az állandósult állapotban vagy a 28. napon (átlag)}}$$

71. A kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőt (BAFK) a ks és a ke hányadosaként kell meghatározni. Az ürülési állandó (ke) meghatározása általában az ürülési görbe alapján történik (amely a vizsgált anyag férgekben mért koncentrációjának alakulását ábrázolja az ürülési fázisban). A felvételi sebességi állandó (ks) ezután a felvételi görbe kinetikájából számítható ki. A BAFK és a sebességi állandók (ks és ke) meghatározásához lehetőleg számítógéppel végzett nemlineáris paraméterbecslést kell használni (lásd a 2. függeléket). Ha az ürülés folyamata nyilvánvalóan nem az elsőrendű kinetikát követi, akkor összetettebb modelleket kell alkalmazni (25) (27) (52).

72. A bióta-üledék felhalmozódási tényező (BSAF) a BAFK-nak a férgek lipidtartalmával és az üledék összes szervesszén-tartalmával történő normalizálása segítségével határozható meg.

Az eredmények értelmezése

73. Amennyiben a vizsgált oldatok koncentrációi az analitikai módszer detektálási határához közeli szinten vannak, az eredményeket óvatosan kell értelmezni.

74. Az egyértelműen definiált felvételi és ürülési görbe megbízható biológiai felhalmozódási adatokat jelez. A jól megtervezett vizsgálatokból származó BAF-értékek konfidencia intervalluma általában nem haladhatja meg a 25 %-ot (5).

Vizsgálati jegyzőkönyv

75. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag

— fizikai jelleg, valamint fizikai-kémiai tulajdonságok, például log K_{ow}, vízben való oldhatóság,

— kémiai azonosító adatok; a vizsgált anyag forrása, illetve az alkalmazott oldószer azonosítása és koncentrációja;

— ha a vizsgált anyag radioaktív izotóppal jelölt, a jelzett atomok pontos helyzete, a fajlagos radioaktivitás és a szennyező anyagokhoz kapcsolódó radioaktivitás százaléka.

A vizsgálathoz használt fajok

— tudományos név, törzs, származás, esetleges előkezelés, akklimatizáció, életkor, mérettartomány, stb.

Vizsgálati körülmények

— alkalmazott vizsgálati eljárás (pl. statikus, félstatikus vagy átfolyásos);

— az alkalmazott megvilágítás típusa és jellemzői, valamint a megvilágítási időszak(ok),

— vizsgálati terv (pl. a vizsgálati kamrák száma, anyaga és mérete, víztérfogat, az üledék tömege és térfogata, a víztérfogat helyettesítési rátája (átfolyásos vagy félstatikus eljárások esetében), a vizsgálat előtti és alatti levegőztetés, az ismétlések száma, a férgek száma ismétlésenként, a vizsgálati koncentrációk száma, a felvételi és ürülési fázis hossza, mintavételi gyakoriság);

▼M6

— a vizsgált anyag előkészítése és alkalmazása, valamint az adott módszer választásának okai,

— névleges vizsgálati koncentrációk;

— a mesterséges víz és a mesterséges üledék összetevőinek forrása vagy – ha természetes közeget használunk – a víz és az üledék eredete, az előkezelés leírása, a vizsgálati állatok használt közegben való élet- és/vagy szaporodóképességének demonstrálása, az üledék jellemzői (a pórusvíz pH-ja és ammóniatartalma (természetes üledékek), szerves-szén-tartalom (TOC), szemcseméret-eloszlás (homok, iszap és agyag százalékban), százalékos víztartalom, és bármely egyéb elvégzett mérés), valamint a víz jellemzői (pH, keménység, vezetőképesség, hőmérséklet, oldott oxigén koncentráció, maradék klór szintek (amennyiben mérjük), és bármely egyéb elvégzett mérés);

— a mesterséges üledék névleges és mért száraz tömege a nedves tömeg %-ában (vagy a száraz tömeg/nedves tömeg arány); a terepi üledék mért száraz tömege a nedves tömeg %-ában (vagy a száraz tömeg/nedves tömeg arány);

— vízminőség a kísérleti kamrákban a hőmérséklettel, pH-val, ammónium-mal, összes keménységgel, valamint az oldott oxigén koncentrációjával jellemezve;

— a víz-, üledék- és féregminták kezelésének részletes bemutatása, beleértve az előkészítés, tárolás, szennyezési eljárások és extrakció részleteit, az analitikai eljárásokat (és pontosságukat) a vizsgált anyagra és a lipidtartalomra vonatkozóan, valamint a vizsgált anyag visszanyerését.

Eredmények

— a kontroll férgek és az egyes vizsgálati kamrákban lévő férgek mortalitása, a megfigyelt szubletális hatások, beleértve a kóros viselkedést (pl. üledék elkerülése, székletpelletek jelenléte vagy hiánya, szaporodás hiánya);

— az üledék és a vizsgálati organizmusok mért száraz tömege a nedves tömeg %-ában (vagy a száraz tömeg/nedves tömeg arány) (hasznos a normalizáláshoz);

— a férgek lipidtartalma;

— a vizsgált anyag férgek általi felvételének és férgekből való kiürülésének kinetikáját ábrázoló görbék, valamint az állandósult állapot eléréséhez szükséges idő,

— C_a, C_s és C_w (adott esetben szórás és terjedelem) minden mintavételi időpontra (a C_a a férgek teljes teste nedves és száraz tömegének kg-jára jutó g-ban, a C_s az üledék nedves és száraz tömegének kg-jára jutó g-ban kifejezve, a C_w mg/l-ben kifejezve). Ha a bióta-üledék felhalmozódási tényezőt (BSAF; a fogalom meghatározását lásd az 1. függelékben) is meg kell határozni (például a különböző lipidtartalmú állatokkal végzett kettő vagy több vizsgálat eredményeinek az összehasonlítása céljára), a C_a az organizmus lipidtartalmának kg-jára jutó g-ban, a C_s pedig az üledék szerves szén (OC) tartalmának kg-jára jutó g-ban is kifejezendő;

— BAF (kg nedves üledék/kg nedves féreg mértékegységben kifejezve), k_s üledék felvételi sebességi állandó (g nedves üledék/kg nedves féreg/nap mértékegységben kifejezve), valamint k_e ürülési sebességi állandó (az egy napra jutó ürülés mértékét fejezi ki); a BSAF (amely azt fejezi ki, hogy az üledék szerves széntartalmának hány kilogrammja jut a férgek lipidtartalmának egy kilogrammjára) értékét is jegyzőkönyvezni lehet;

▼**M6**

— Nem kiválasztott maradványok (NER) az ürülési fázis végén;

— ha mérjük: a vizsgálati állatokban kimutatott kiindulási anyag, bomlástermékek, kötött maradványok százalékos aránya (azaz a vizsgált anyag százalékos aránya, amely a szokásos extrakciós módszerekkel nem vonható ki);

— az adatok statisztikai elemzéséhez használt módszerek.

Az eredmények értékelése

— az eredmények megfelelése a 21. pontban felsorolt érvényességi kritériumoknak,

— váratlan vagy szokatlan eredmények, pl. a vizsgált anyag hiányos kiürülése a vizsgálati állatokból; ilyen esetekben az előzetes vizsgálatok eredményei szolgálhatnak hasznos információkkal.

▼M6

1. függelék

Fogalommeghatározások és mértékegységek

Mesterséges üledék vagy formulázott, kevert vagy szintetikus üledék: anyagoknak a természetes üledék fizikai összetevőinek imitálására használt keveréke.

Biológiai felhalmozódás: a vizsgált anyag koncentrációjának növekedése egy szervezetben/szervezeten a vizsgált anyagnak a környező közegben lévő koncentrációjához viszonyítva. A biológiai felhalmozódás biokoncentrációs és biomagnifikációs folyamatok eredménye (lásd lentebb).

Biológiai felhalmozódási tényező (BAF): a vizsgált anyag koncentrációja a vizsgálati szervezetben vagy a vizsgálati szervezeten (C_a, a férgek nedves vagy száraz tömegének kg-jára jutó grammban kifejezve) a biológiai felhalmozódási vizsgálat felvételi fázisának bármely időpontjában, elosztva az anyag környező közegben mért koncentrációjával (C_s, az üledék nedves vagy száraz tömegének kg-jára jutó grammban kifejezve). Annak érdekében, hogy a BAF a C_a és a C_s mértékegységére hivatkozzon, a BAF-et kg üledék/kg féreg mértékegységben adják meg (15).

Az üledékfelvételi sebességi állandónak az ürülési sebességi állandókkal (k_s és k_e – lásd alább) történő elosztásával kapott arányból közvetlenül számított **biológiai felhalmozódási tényezőket** kinetikai biológiai felhalmozódás tényezőnek (BAFK) nevezik.

Biokoncentráció: a vizsgált anyag koncentrációjának növekedése egy szervezetben/szervezeten – kizárólag a testfelületen keresztül történő felvétel eredményeként – a vizsgált anyagnak a környező közegben lévő koncentrációjához viszonyítva.

Biomagnifikáció: a vizsgált anyag koncentrációjának növekedése egy szervezetben/szervezeten – kizárólag szennyezett táplálékból vagy zsákmányállatból való felvétel eredményeként – a vizsgált anyagnak a szennyezett táplálékban vagy zsákmányállatban lévő koncentrációjához viszonyítva. A biomagnifikáció a vizsgált anyag táplálékhálón belüli átadásához vagy felhalmozódásához vezethet.

Bióta-üledék felhalmozódási tényező (BSAF): a vizsgált anyag vizsgálathoz használt organizmusban/organizmuson mért, lipidtartalomra vonatkoztatott egyensúlyi koncentrációjának és a vizsgált anyag üledékben mért, szerves széntartalomra vonatkoztatott koncentrációjának hányadosa az állandósult állapotban. A C_a értékét az organizmus lipidtartalmának kilogrammjára jutó grammban, a C_s értékét pedig az üledék szerves széntartalmának kilogrammjára jutó grammban fejezzük ki.

A **kondicionálási időszakot** az üledék mikrobiális komponensének stabilizálására és pl. az üledékösszetevőkből származó ammónia eltávolítására használjuk; az üledék vizsgált anyaggal való szennyezése előtt zajlik. A fedővizet a kondicionálás után általában elöntjük.

Ürülés: a vizsgált anyag kiürülése a vizsgálathoz használt organizmus szövetéből aktív vagy passzív folyamatok eredményeként, amelyek a vizsgált anyag környező közegben való jelenlététől vagy hiányától függetlenül mennek végbe.

Ürülési fázis: azt az időtartamot jelöli, amelyen keresztül a vizsgált anyag vizsgálathoz használt organizmusokból való kiürülését (vagy a vizsgálathoz használt organizmusokban való nettó csökkenését) vizsgáljuk a vizsgálathoz használt organizmusok szennyezett közegből a vizsgált anyagot nem tartalmazó közegbe való áthelyezését követően.

Ürülési sebességi állandó (k_e): a vizsgált anyag vizsgálathoz használt organizmusban/organizmuson mért koncentrációjának a vizsgálathoz használt organizmusok vizsgált anyagot tartalmazó közegből a vizsgált anyagot nem tartalmazó közegbe való áthelyezését követő csökkenésének ütemét meghatározó számérték; a k_e az egy napra jutó ürülés mértékét fejezi ki.

▼M6

Kiegyensúlyozódási időszak: lehetővé teszi a vizsgált anyagnak a szilárd fázis, a pórusvíz és a fedővíz közötti eloszlását; az üledék vizsgált anyaggal való szennyezése után és a vizsgálati organizmusok hozzáadása előtt kerül rá sor.

Oktanol-víz megoszlási hányados (K_{ow}): az anyag n-oktanolban és vízben való oldhatóságának a hányadosa az egyensúlyi állapotban, esetenként P_{ow}-val is jelölik. Az anyag vízi szervezetekben való biológiai felhalmozódási képességének kifejezésére a K_{ow} logaritmusát (log K_{ow}) használjuk.

Szerves szén – víz megoszlási hányados (K_{oc}): az anyag üledék szerves szén frakciójában/frakcióján és vízben mért koncentrációjának a hányadosa az egyensúlyi állapotban.

Fedővíz: az üledék fölött elhelyezkedő víz a vizsgálati edényben.

Állandósult állapot vagy **plató**: az expozíciós fázisban párhuzamosan végbemenő felvételi és ürülési folyamatok közötti egyensúly. Az állandósult állapot akkor következik be, amikor a mintavételi időpontokban mért BAF alakulását az idő függvényében ábrázoló görbe párhuzamossá válik az időtengellyel, és a legalább kétnapos időközönként vett három egymást követő mintán végzett BAF analízis eredménye 20 %-nál kisebb eltérést mutat, és a három mintavételi időszak nem mutat statisztikailag szignifikáns eltéréseket. Ha a vizsgált anyag felvétele lassú, helyénvalóbb lehet a hétnapos időközök alkalmazása (5).

Pórusvíz vagy szemcseközi víz: az üledék vagy a talaj szemcséi közötti helyet kitöltő víz.

Üledékből való felvétel sebességi állandója (k_s): a vizsgált anyag vizsgálathoz használt organizmusban/organizmuson mért koncentrációjának a vizsgált anyag üledékfázisból való felvétele eredményeként bekövetkező növekedésének ütemét meghatározó számérték. A k_s azt fejezi ki, hogy egy napra vetítve az üledék hány grammja jut a férgek kilogrammjára.

Szennyezett üledék: a vizsgált anyaggal szennyezett üledék.

Állandósult állapothoz tartozó biológiai felhalmozódási tényező (BAF_{ss}): az állandósult állapothoz tartozó BAF, amely nem változik jelentősen egy hosszabb időtartamon keresztül, amely alatt a vizsgált anyag koncentrációja a környező közegben (C_s, az üledék száraz tömegének kg-jára jutó grammban kifejezve) állandó.

Felvételi vagy expozíciós fázis: azt az időtartamot jelöli, amelyen keresztül a vizsgálathoz használt organizmusok ki vannak téve a vizsgált anyag hatásának.

▼M6

2. függelék

A felvételi és az ürülési paraméterek kiszámítása

A biológiai felhalmozódási vizsgálatok fő végpontja a biológiai felhalmozódási tényező (BAF). A mért BAF-t úgy lehet kiszámítani, hogy az állandósult állapotban elosztjuk a vizsgált anyag vizsgálati organizmusokban mért koncentrációját (C_a) a vizsgált anyag üledékben mért koncentrációjával (C_s). Amennyiben az állandósult állapotot a felvételi fázis alatt nem sikerült elérni, a BAF értékét ugyanígy számítjuk ki a 28. napra. Jelezni kell azonban, hogy a BAF az állandósult állapothoz tartozó koncentrációkon alapul-e vagy sem.

A kinetikus biológiai felhalmozódási tényezők (BAF_K), az üledék felvételi sebességi állandó (k_s) és az ürülési sebességi állandó (k_e) kiszámításának előnyben részesített eszköze a számítógéppel végzett nemlineáris paraméterbecslés. Tekintetbe véve a felvételi fázis átlagos felhalmozási tényezőinek (C_a, a mintavételi időpontok átlagai / C_s, a mintavételi időpontok átlagai = AF) idősorát a férgek és az üledék nedves tömege alapján, valamint a következő modellegyenletet:

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[1. egyenlet]}$$

ahol AF(t) a vizsgált anyag férgekben mért koncentrációjának és üledékben mért koncentrációjának aránya a felvételi fázis bármely adott időpontjában (t), ezek a számítógépes programok kiszámítják a BAF_K, k_s és k_e értékeket.

Ha sikerül elérni az állandósult állapotot a felvételi fázisban (azaz $t = \infty$), az 1. egyenletet lehet tovább lehet egyszerűsíteni:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[2. egyenlet]}$$

ahol

k_s = felvételi sebességi állandó a szövetben [g üledék / kg féreg / nap]

k_e = ürülési sebességi állandó [nap^{-1}]

Ezt követően a vizsgált anyag állandósult állapothoz tartozó koncentrációja a féregszövetben ($C_{a,ss}$) a $k_s/k_e \times C_s$ képlettel számítható ki.

A bióta-üledék felhalmozódási tényezőt (BSAF) a következőképpen kell kiszámítani:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

ahol f_{oc} az üledék szerves szén frakciója, f_{lip} pedig a féreg lipidfrakciója, mindkettő a száraz tömeg vagy a nedves tömeg alapján.

A koncentrációértékek adott idősora esetén az ürülési kinetikát a következő modellegyenletekkel és nemlineáris paraméterbecslési módszeren alapuló számítógépes kalkulációval lehet modellezni.

A felvételi fázis végén mért átlagos testi maradványértéket ajánlott alapértelmezett kiindulási pontként használni. A felvételi fázisból modellezett/becsült érték csak akkor használható, ha pl. a mért érték jelentősen eltér a modellezett testi maradványértéktől. Lásd még az 50. pontot az ürülésre kijelölt férgek alternatív előexpozíciójával kapcsolatban; e megközelítés esetén az előexponált férgekből az ürülési fázis 0. napján vett mintákat úgy tekintik, hogy reális testi maradványértéket biztosítanak az ürülési kinetika elindításához.

▼M6

Ha az idő függvényében ábrázolt adatpontok a vizsgált anyag állatokban mért koncentrációjának folyamatos exponenciális csökkenését jelzik, akkor az ürülés időbeli lefolyása egykompartmentes modellel (4. egyenlet) jellemezhető.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[3. egyenlet]}$$

Az ürülési folyamatok esetenként kétfázisúak, azaz a korai fázisban a C_a gyors csökkenése figyelhető meg, amelyet az ürülés későbbi fázisaiban a vizsgált anyagok koncentrációjának lassúbb csökkenése vált fel, például (8) (19) (25). A két fázis azzal a feltevéssel értelmezhető, hogy a szervezet két különböző kompartmentből áll, amelyekből eltérő sebességgel ürül ki a vizsgált anyag. Ebben az esetben tanulmányozni kell a vonatkozó szakirodalmat, például (15) (16) (17) (25).

A kétkompartmentes ürülést például a következő egyenlet írja le (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[4. egyenlet]}$$

A és B a kompartmentek méretét jelenti (a teljes szöveti maradvány százalékában), ahol A az anyag gyors elvesztését mutató kompartment, és B a vizsgált anyag lassú elvesztését mutató kompartment. A és B összege az állat teljes kompartmenttérfogatának 100 %-ával egyenlő az állandósult állapotban. A k_a és k_b a megfelelő ürülési állandókat képviseli [nap^{-1}]. Ha a kétkompartmentes modellt a tisztulási adatokhoz illesztjük, a felvételi sebességi állandó (k_s) a következőképpen határozható meg (53) (54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[5. egyenlet]}$$

Mindazonáltal ezeket a modellegyenletek körültekintően kell alkalmazni, különösen, ha a vizsgálat során változás következik be a vizsgált anyag biológiai hozzáférhetőségében (42).

Alternatív megoldásként a fenti modellegyenletekkel egyszerre is kiszámíthatók a kinetikai paraméterek (k_s és k_e), ha az elsőrendű kinetikai modellt a felvételi és az ürülési fázisból származó valamennyi adatra egyidejűleg alkalmazzuk. A felvételi és az ürülési sebességi állandók együttes kiszámítását lehetővé tévő módszer leírása az (55), (56) és (57) szakirodalmi hivatkozásban megtalálható.

A nem kiválasztott maradványokat (NER) másodlagos végpontként kell kiszámítani úgy, hogy a férgekben az ürülési fázis 10. napján mért átlagos koncentráció (C_a) és a férgekben az állandósult állapotban (a felvételi fázis 28. napján) mért átlagos koncentráció (C_a) arányát megszorozzuk 100-zal:

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{az ürülés végén}(\text{átlag}) \times 100}{C_a \text{az állandósult állapotban}(\text{átlag})}}$$

▼**M6**

3. függelék

Példa a 28 napos biológiai felhalmozódási vizsgálat mintavételi ütemtervére

a) **felvételi fázis (beleértve a 4 napos kiegyensúlyozódási fázist)**

Nap	Tevékenységek
– 6	A tőzegszuszpenzió elkészítése üledéknek; a szuszpenzió kondicionálása 48 órán át;
– 4	Az üledék vagy az üledékfrakció szennyezése; az üledékösszetevők összekeverése; üledékminták vétele a kezelt és az oldószeres kontroll üledékekből a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározására; a fedővíz hozzáadása; inkubáció vizsgálati körülmények mellett (kiegyensúlyozódási fázis);
– 3/– 2	A vizsgálati organizmusok elválasztása a tenyészettől akklimatizáció céljából;
0	A vízminőség mérése (lásd az 52. pontot); ismétlések eltávolítása víz- és üledékminták vételére a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározása céljából; a férgek randomizált elosztása a vizsgálati kamrákba; elegendő féreg-részminta visszatartása az analitikai háttérértékek meghatározásához; a levegőellátás ellenőrzése, ha zárt vizsgálati rendszert használunk;
1	Ismétlések eltávolítása mintavételre; a levegőellátás, a férgek viselkedése, a vízminőség ellenőrzése (lásd az 56. pontot); víz-, üledék- és féregminták vétele a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározására;
2	A levegőellátás, a férgek viselkedése és a hőmérséklet ellenőrzése;
3	Ugyanaz, mint az 1. napon;
4–6	Ugyanaz, mint az 2. napon;
7	Ugyanaz, mint az 1. napon; szükség esetén pótoljuk az elpárolgott vizet;
8–13	Ugyanaz, mint az 2. napon;
14	Ugyanaz, mint az 1. napon; szükség esetén pótoljuk az elpárolgott vizet;
15–20	Ugyanaz, mint az 2. napon;
21	Ugyanaz, mint az 1. napon; szükség esetén pótoljuk az elpárolgott vizet;
22–27	Ugyanaz, mint az 2. napon;
28	Ugyanaz, mint az 1. napon; a vízminőség mérése (lásd az 52. pontot); a felvételi fázis vége; elegendő féreg-részminta megőrzése az analitikai háttérértékek, a nedves és száraz tömeg, valamint a lipidtartalom meghatározásához; a fennmaradó expozíciós ismétlésekből a férgek áthelyezése tiszta üledéket tartalmazó edényekbe az ürülési fázishoz (nincs bélürítés); víz-, üledék- és féregminták vétele az oldószeres kontrollokból; mintavétel a csapdákban lévő oldatokból, ha vannak.
	Az expozíció előtti tennivalókat (kiegyensúlyozódási fázis) a vizsgált anyag tulajdonságainak figyelembevételével kell ütemezni. Szükség esetén az előkészített üledék kondicionálása fedővíz alatt 20 ± 2 °C-on 7 napig; ebben az esetben az üledéket korábban kell elkészíteni!
	A 2. napnál leírt tennivalókat minden nap el kell végezni (legalább munkanapokon).

▼**M6**

b) **Ürülési fázis**

Nap	Tevékenység
–6.	A tőzegszuszpenzió elkészítése üledéknek; a szuszpenzió kondicionálása 48 órán át;
–4.	Az üledékösszetevők összekeverése; üledékminták eltávolítása a kezelt és az oldószeres kontroll üledékekből a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározására; a fedővíz hozzáadása; inkubáció vizsgálati körülmények mellett;
0. (a felvételi fázis 28. napja)	A vízminőség mérése (lásd az 52. pontot); a férgek áthelyezése a fennmaradó expozíciós ismétlésekből tiszta üledéket tartalmazó edényekbe; **4–6 óra**után az ismétlések eltávolítása víz-, üledék- és féregminták vételére a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározása céljából; a férgek randomizált elosztása a vizsgálati kamrákba;
1.	Ismétlések eltávolítása mintavételre; a levegőellátás, a férgek viselkedése, a vízminőség ellenőrzése (lásd az 52. pontot); víz-, üledék- és féregminták vétele a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározására;
2.	A levegőellátás, a férgek viselkedése és a hőmérséklet ellenőrzése;
3.	Ugyanaz, mint az 1. napon;
4.	Ugyanaz, mint az 2. napon;
5.	Ugyanaz, mint az 1. napon;
6.	Ugyanaz, mint az 2. napon;
7.	Ugyanaz, mint az 1. napon; szükség esetén pótoljuk az elpárolgott vizet;
8–9.	Ugyanaz, mint az 2. napon;
10.	Ugyanaz, mint az 1. napon; az ürülési fázis vége; a vízminőség mérése (lásd az 52. pontot); víz-, üledék- és féregminták vétele az oldószeres kontrollokból; mintavétel a csapdákban lévő oldatokból, ha vannak.
	Az ürülési fázis kezdete előtt ugyanúgy kell elkészíteni az üledéket, mint a felvételi fázis előtt.
	A 2. napnál leírt tennivalókat minden nap el kell végezni (legalább munkanapokon).

▼**M6**

4. függelék

Az elfogadható minőségű hígítóvíz néhány fizikai-kémiai tulajdonsága

ÖSSZETEVŐ	KONCENTRÁCIÓ
Finomszemcsés anyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2µg/l
Ionizálatlan ammónia	< 1 µg/l
Maradék klór	< 10 µg/l
Szerves foszfort tartalmazó növényvédő szerek	< 50 ng/l
Összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer plusz poliklórozott bifenilek	<50 ng/l
Összes szerves klór	< 25 ng/l

AZ AJÁNLOTT MESTERSÉGES VÍZ ÖSSZETÉTELE

a) Kalcium-klorid oldat

Oldjunk fel 11,76 g $CaCl_2.2H_2O$-t ioncserélt vízben; töltsük fel 1 l-re ioncserélt vízzel

b) Magnézium-szulfát oldat

Oldjunk fel 4,93 g $MgSO_4.7H_2O$-t ioncserélt vízben; töltsük fel 1 l-re ioncserélt vízzel

c) Nátrium-karbonát oldat

Oldjunk fel 2,59 g $NaHCO_3$-t ioncserélt vízben; töltsük fel 1 l-re ioncserélt vízzel

d) Kálium-klorid oldat

Oldjunk fel 0,23 g KCl-t ioncserélt vízben; töltsük fel 1 l-re ioncserélt vízzel

Minden kémiai anyagnak analitikai tisztaságúnak kell lennie.

A desztillált vagy ioncserélt víz vezetőképessége nem haladhatja meg a 10 μScm^{-1} értéket.

Keverjünk össze 25 ml-t az a)–d) oldatok mindegyikéből, és a teljes térfogatot töltsük fel 1 literre ioncserélt vízzel. Ebben az oldatban a kalcium- és magnéziumionok összege 2,5 mmol/l.

A Ca:Mg ionok aránya 4:1, a Na:K ionoké pedig 10:1. Az oldat savas kapacitása ($K_{S4,3}$) 0,8 mmol/l.

A hígítóvizet az oxigéntelítettség eléréséig levegőztessük, majd felhasználás előtt körülbelül két napig további levegőztetés nélkül tároljuk.

A fedővíz pH-értékének a 6–9 tartományban kell lennie.

▼M6

5. függelék

Mesterséges üledék – elkészítés és tárolás

A C.8. vizsgálati módszer követelményeivel ellentétben (40) a száraz tömeg 10 %-a helyett 2 % tőzegtartalom ajánlott a mesterséges üledékben, hogy az üledék megfeleljen a természetes üledékek alacsony-közepes szervesanyag-tartalmának (58).

A mesterséges üledék száraz összetevőinek százalékos aránya:

Összetevő	Jellemzők	% száraz üledék
Tőzeg	Tőzegmoha tőzeg, a lebomlás foka: „közepes”, levegőszáraz, látható növényi maradványok nincsenek, finomra őrölt (szemcseméret ≤ 0,5 mm)	2 ± 0,5
Kvarchomok	Szemcseméret: ≤ 2 mm, de a részecskék > 50 %-ának 50–200 μm között kell lennie	76
Kaolinit agyag	Kaolinittartalom ≥ 30 %	22 ± 1
Táplálékforrás	*Folia urticae*, az *Urtica*-fajok (nagy csalán) porított levelei, finomra őrölve (részecskeméret ≤ 0,5 mm), vagy az *Urtica*-fajok porított leveleinek keveréke alfa-cellulózzal (1:1); a gyógyszertári szabványoknak megfelelően, emberi fogyasztásra; a száraz üledékhez hozzáadva	0,4–0,5 %
Kalcium-karbonát	$CaCO_3$, porított, kémiailag tiszta, a száraz üledékhez hozzáadva	0,05–1
Ioncserélt víz	Vezetőképesség ≤ 10 μS/cm, a száraz üledékhez hozzáadva	30–50

Ha megemelkedett ammóniakoncentrációk várhatók – például ha a vizsgált anyagról ismert, hogy gátolja a nitrifikációt –, hasznos lehet a nitrogénben gazdag Urtica-por 50 %-át cellulózzal helyettesíteni (pl. α-cellulóz por, kémiailag tiszta, részecskeméret ≤ 0,5 mm).

Elkészítés

A tőzeget levegőn megszárítjuk és finom porrá őröljük (szemcseméret ≤ 0,5 mm, látható növényi maradványok nélkül). A szükséges mennyiségű tőzegporból a száraz üledékhez adandó ioncserélt víz egy részével (a tőzeg száraz tömege 11,5-szeresének megfelelő vízmennyiséget elegendőnek találták a keverhető tőzegiszap elkészítéséhez (8)) szuszpenziót állítunk elő nagy teljesítményű homogenizáló készülék segítségével.

A szuszpenzió pH-ját $CaCO_3$ hozzáadásával 5,5 ± 0,5 értékre állítjuk be. A pH és a mikrobiológiai összetétel stabilizálása céljából a szuszpenziót 20 ± 2 °C hőmérsékleten lassú keveréssel legalább két napig kondicionáljuk. A végtermékként kapott keverék pH-ját ismételten megmérjük, és szükség esetén $CaCO_3$ hozzáadásával 6,0 ± 0,5 értékre állítjuk be. Ezután az egész szuszpenziót összekeverjük a többi száraz összetevővel, figyelembe véve a szennyezéshez használt részt. Hozzáadjuk a maradék ioncserélt vizet, hogy homogén üledéket kapjunk. A pH-t ismételten megmérjük, és szükség esetén $CaCO_3$ hozzáadásával 6,5–7,5 értékre állítjuk be. Ha azonban ammónia képződése várható, akkor hasznos lehet az üledék pH-ját 7,0 alatt tartani (pl. 6,0–6,5 között). Az üledékből vett minta alapján meghatározzuk a száraz tömeget és a szerves széntartalmat. Ha ammónia képződése várható, a mesterséges üledéket hét napig kondicionálni lehet olyan körülmények mellett, mint amelyek az ezt követő vizsgálat során, a vizsgált anyaggal történő szennyezés előtt érvényesülnek (pl. üledék-víz arány 1: 4, az üledékréteg magassága megegyezik a vizsgálati edényekben lévő magassággal), azaz fel kell önteni vízzel, amelyet levegőztetni kell. A kondicionálási időszak végén a fedővizet el kell távolítani és ki kell önteni. Az üledékből mintákat veszünk a száraz tömeg és az összes szerves széntartalom meghatározására (pl. 3 mintát).

▼M6

Ezt követően minden kezelési szint esetében összekeverjük a szennyezett kvarchomokot az üledékkel, majd az üledéket szétosztjuk a párhuzamos kezelt edények között, és feltöltjük a vizsgálati vízzel (pl. üledék-víz arány 1: 4, az üledékréteg magassága megegyezik a vizsgálati edényekben lévő magassággal). Az edényeket ezután a rákövetkező vizsgálat során érvényesülő feltételekkel megegyező feltételek mellett inkubáljuk. Ez az a pont, ahol a kiegyenlítődési időszak elkezdődik. A fedővizet levegőztetni kell.

A kiválasztott táplálékforrást az üledék vizsgált anyaggal való szennyezése előtt vagy alatt kell hozzáadni. Össze lehet keverni a tőzegszuszpenzióval is (lásd fent). A táplálékforrás túlzott lebomlása a vizsgálati organizmusok hozzáadása előtt – pl. hosszú kiegyensúlyozódási időszak esetén – úgy kerülhető el, ha a táplálék hozzáadása és az expozíció kezdete közötti időtartam a lehető legrövidebb. Annak érdekében, hogy a táplálék elegendő ideig kontaktusban legyen a vizsgált anyaggal, a táplálékforrást legkésőbb azon a napon kell összekeverni az üledékkel, amikor az üledéket beszennyezik a vizsgált anyaggal. Kivételt lehet tenni, ha a kiegyensúlyozódási időszak hossza a táplálék túlzott mikrobiológiai lebomlásához vezet a vizsgált organizmusok hozzáadása előtt. Az üledékből mintákat veszünk a száraz tömeg és az összes szerves széntartalom meghatározására (pl. 3 mintát a szennyezett vagy kontroll üledékből).

A komponensek száraz tömegét (tőzeg, homok, kaolin) g-ban és a teljes száraz tömeg százalékában kell jegyzőkönyvezni.

A száraz komponensekhez az üledék elkészítése során hozzáadandó víztérfogatot is az összes száraz tömeg százalékában kell jegyzőkönyvezni (pl. a 100 % száraz tömeg + 46 % víz azt jelenti, hogy 1 000 g száraz tömeg összesen 460 ml vizet kap, ami 1 460 g nedves üledéket eredményez).

Tárolás

A mesterséges üledék száraz összetevőit száraz, hűvös helyen vagy szobahőmérsékleten lehet tárolni. Az elkészített nedves üledék 4 ± 2 °C-on, sötétben, az elkészítés napjától számított 2–4 héten át tárolható (csak a tenyészetben történő további használatra) (8).

A vizsgált anyaggal szennyezett üledéket azonnal fel kell használni, kivéve, ha olyan információk állnak rendelkezésre, amelyek szerint az adott üledék tárolása nem befolyásolja a vizsgált anyag toxicitását és biológiai hozzáférhetőségét. A szennyezett üledékmintákat az adott vizsgált anyag esetében ajánlott körülmények között lehet tárolni az analízis elvégzéséig.

▼M6

6. függelék

A biológiai felhalmozódás vizsgálatához ajánlott kevéssertéjű-fajok

***Tubifex tubifex* (Müller), Tubificidae, Oligochaeta**

A tubificid kevéssertéjűek (Tubificidae, Oligochaeta) közé tartozó *Tubifex tubifex* (Müller) édesvízi üledékekben, nyálkával kibélelt csövekben él. A férgek fejjel lefelé laknak ezekben a csövekben, és üledékrészecskéket fogyasztanak, hasznosítva az azokhoz kötődő mikroorganizmusokat és szerves törmeléket. A férgek hátsó vége általában a fedővízben hullámzik légzés céljából. Bár a *Tubifex tubifex* az egész északi féltekén, számos üledéktípusban megél, a viszonylag finom szemcseméretű üledékeket kedveli (59). A faj ökotoxikológiai vizsgálatok céljára való megfelelőségét mutatja be például a (8) (29) (31) (39) (60) (62) (63) szakirodalom.

A tenyésztés módszerei

A férgeket állandó laboratóriumi tenyészetben kell tartani, hogy elegendő számú *Tubifex tubifex* álljon rendelkezésre a biológiai felhalmozódási vizsgálatok lefolytatására. A *T. tubifex* tenyésztésre a C.8. vizsgálati módszer szerinti mesterséges talajon alapuló mesterséges üledékből (40) és a C.1. vizsgálati módszer szerinti mesterséges vízből álló rendszer ajánlott (8).

Tenyésztőedényként 12–20 cm magasságú üveg- vagy rozsdamentes acéltartályokat lehet használni. Minden tenyésztőtartályba egy réteg – az 5. függelékben leírt módon előállított – nedves mesterséges üledéket kell tölteni. Az üledékréteg mélységének lehetővé kell tennie a férgek természetes üledékbe ásó viselkedését (*T. tubifex* esetén a minimális mélység 2 cm). A rendszerhez mesterséges vizet adunk. Ügyelni kell arra, hogy csak minimális mértékben kavarjuk fel az üledéket. A víztestet egy 2 cm-rel az üledékfelszín fölött elhelyezett Pasteur-pipettán keresztül óvatosan levegőztetjük (pl. 2 buborék másodpercenként, 0,45 μm pórusméretű szűrőn átszűrt levegőből). Az ajánlott tenyésztési hőmérséklet 20 ± 2 °C.

A férgeket 20 000 példány/m^2 üledékfelület maximális betelepítési sűrűséggel adjuk hozzá a tenyészethez. A nagyobb betelepítési sűrűség a növekedés és a szaporodás sebességének csökkenését okozhatja (43).

A mesterséges üledéket tartalmazó tenyészetekben a férgeket táplálni kell. A finomra őrölt haleledelből (pl. TetraMin®) álló étrend kiegészítő táplálékként szolgálhat (8); Klerks, 1994., személyes közlés. A táplálási aránynak lehetővé kell tennie a férgek kielégítő növekedését és szaporodását, illetve minimális szinten kell tartania az ammónia felhalmozódását és gombák növekedését a tenyészetben. A táplálék hetente kétszer adható (pl. 0,6–0,8 mg/cm^2 üledékfelszín). A gyakorlati tapasztalat azt mutatja, hogy az ioncserélt vízben szuszpendált és homogenizált táplálék alkalmazása megkönnyítheti a táplálék homogén eloszlását a tenyésztőtartályokban lévő üledék felszínén.

Az ammónia felhalmozódásának elkerülése érdekében a fedővizet cserélni kell, vagy átfolyásos rendszer használatával, vagy – legalább hetente egyszer – manuálisan. A törzstenyészetekben az üledéket háromhavonta kell cserélni.

A tenyészetből történő féregminta vétele céljából a tenyésztőüledéket 1 mm-es szitán kell átszitálni, ha csak felnőtt egyedekre van szükség. A bábok visszatartására 0,5 mm-es szita, a fiatal férgek visszatartására pedig 0,25 mm-es szita alkalmas. A szitákat az üledék áthaladása után mesterséges vízbe lehet helyezni. A férgek elhagyják a hálót, és a vízből lágyacél csipesszel vagy tűzzel polírozott élű pipettával lehet összeszedegetni őket.

▼M6

Kizárólag a Tubifex tubifex ép és egyértelműen azonosított példányait (pl. (64)) lehet egy vizsgálat vagy új tenyészet elindításához használni. A beteg vagy sérült férgeket, valamint a gombafonalakkal fertőzött bábokat meg kell semmisíteni.

A szinkron tenyészet megfelelő időközönként meghatározott korú férgeket biztosíthat. Választott időközönként (pl. kéthetente) új tenyésztőedényeket állítunk be, amelyeket meghatározott korú állatokkal indítunk el (pl. bábokkal). Az itt leírt tenyésztési körülmények mellett a férgek 8–10 hét után elérik a felnőtt kort. A tenyészetből az állatokat akkor lehet begyűjteni, amikor a férgek már új bábokat raktak, pl. tíz hét után. A mintázott felnőttek vizsgálatokhoz használhatók, míg a bábokkal új tenyészetek indíthatók.

***Lumbriculus variegatus* (Müller), Lumbriculidae, Oligochaeta**

A *Lumbriculus variegatus* (Lumbriculidae, Oligochaeta) szintén az édesvízi üledékek lakója világszerte, és széles körben használják ökotoxikológiai vizsgálatokhoz. A faj biológiájára, tenyésztési körülményeire és érzékenységére vonatkozó információk az (1) (6) (9) (36) szakirodalmi hivatkozásban találhatók. Bizonyos korlátozásokkal a *Lumbriculus variegatus* is tenyészthető a *T. tubifex* esetében ajánlott, a (8) szakirodalmi hivatkozás szerinti mesterséges üledékben. Mivel a természetben a *L. variegatus* a *T. tubifex*-hez képest a durvább üledékeket kedveli (59), a *T. tubifex* esetében használt mesterséges üledékkel készített laboratóriumi tenyészetek 4–6 hónap után megszűnhetnek. A gyakorlati tapasztalat azt mutatja, hogy a *L. variegatus* fajt a szubsztrátum megújítása nélkül több éven át lehet tartani homokos szubsztrátumban (pl. kvarchomok, apró szemcséjű kavics), átfolyásos rendszerben, táplálékforrásként haleledelt használva. A *L. variegatus* legnagyobb előnye az egyéb kevéssertéjű-fajokkal szemben a gyors szaporodás, amely gyorsan növekvő biomasszát eredményez a laboratóriumban tenyésztett populációkban (1) (6) (9) (10).

Tenyésztési módszerek

A *Lumbriculus variegatus* tenyésztési feltételeit Phipps és mtsai (1993) (10), Brunson és mtsai (1998) (28), ASTM (2000) (1), US EPA (2000) (6) ismerteti részletesen. Az alábbiakban röviden ismertetjük ezeket a feltételeket.

A férgeket nagy akváriumokban (57–80 l) lehet tenyészteni, 23 °C-on, 16 óra világos és 8 óra sötét megvilágítási időszakkal (100–1 000 lux), naponta megújított természetes víz felhasználásával (45–50 l/akvárium). A szubsztrátumot úgy állítjuk elő, hogy fehérítetlen barna papírtörlőket csíkokra vágunk, majd ezeket néhány másodpercig összeturmixoljuk tenyésztővízzel, ami kis papírszubsztrátum-darabokat eredményez. Ez a szubsztrátum közvetlenül használható a *Lumbriculus* tenyésztőakváriumokban a tartály alsó területének lefedésére, vagy a későbbi felhasználásig ioncserélt vízben lefagyasztva tárolható. Az új szubsztrátum a tartályban általában körülbelül két hónapig tart.

A féregtenyészeteket 500–1 000 féreggel indítjuk el és a férgeket megújítási vagy átfolyásos feltételek mellett heti 3 alkalommal megetetjük 6 g pisztráng starter tápot tartalmazó 10 ml szuszpenzióval. A statikus vagy félstatikus tenyészetekben a baktériumok és gombák szaporodásának megelőzése érdekében alacsonyabb táplálási arányt kell alkalmazni. A táplálékot és a papírszubsztrátumot analizálni kell a biológiai felhalmozódási vizsgálatokban használt anyagokra.

Ilyen körülmények között az egyedek száma a tenyészetben körülbelül 10–14 naponta megduplázódik.

A *Lumbriculus variegatus* faj egyedeit pl. a szubsztrátum finom háló segítségével történő áthelyezésével, vagy az organizmusok tűzzel polírozott széles szájú (kb. 5 mm átmérőjű) üvegpipettával külön főzőpohárba történő áthelyezésével lehet eltávolítani a tenyészetből. Ha a szubsztrátumot is átrakjuk a főzőpohárba, a

▼M6

férgeket és szubsztrátumot egyaránt tartalmazó főzőpoharat egy éjszakán át átfolyásos körülmények között hagyjuk, ami eltávolítja a szubsztrátumot a főzőpohárból, miközben a férgek az edény alján maradnak. Ezeket a férgeket azután újonnan előállított tenyésztőtartályokban lehet elhelyezni, vagy az (1) és (6) szakirodalomban vázoltak szerint feldolgozni a vizsgálat céljára. A férgek sérülését vagy autotómiáját meg kell akadályozni, pl. a férgek kezeléséhez tűzzel polírozott élű pipettát vagy rozsdamentes acél pálcikát használva.

A *L. variegatus* üledék biológiai felhalmozódási vizsgálatokban való használata során kritikusan kezelendő kérdés a faj szaporodásának módja (architomia, amelyet morphallaxis követ). Ez az ivartalan szaporodás két fragmentumot eredményez, amelyek egy ideig nem táplálkoznak, amíg a fej- vagy farokrész nem regenerálódik (pl. (36) (37)). Ez azt jelenti, hogy a *L. variegatus* fajban az üledék és a szennyeződés elfogyasztás útján történő felvétele nem folyamatosan zajlik, mint a tubifexekben, amelyek nem fragmentálódás útján szaporodnak.

Ezért az ellenőrizetlen reprodukció és regeneráció, illetve az azt követő nagyon változó vizsgálati eredmények minimalizálása érdekében szinkronizálást kell végezni. Ilyen eltérések akkor fordulhatnak elő, ha egyes példányok – amelyek fragmentálódtak és ezért egy bizonyos időszakban nem táplálkoznak – kevésbé vannak kitéve a vizsgált anyagnak, mint azok a példányok, amelyek a vizsgálat alatt nem fragmentálódtak (9) (10) (38). Az expozíció megkezdése előtt 10–14 nappal a férgeket mesterségesen fragmentálni kell (szinkronizálás). Nagy férgeket kell használni, amelyek lehetőleg nem mutatják közelmúltban történt fragmentálódás jeleit. A férgeket egy csepp tenyésztővízben egy tárgylemezre helyezzük, és a középső testrégióban szikével kettévágjuk. Ügyelni kell arra, hogy a hátsó végek hasonló méretűek legyenek. Ezután a hátsó végeket az expozíció kezdetéig hagyni kell új fejeket növeszteni egy olyan tenyésztőedényben, amely ugyanolyan szubsztrátumot tartalmaz, mint amilyet a tenyésztés során használtunk, valamint mesterséges vizet. Az új fejek regenerációját az jelzi, ha a szinkron férgek beássák magukat a szubsztrátumba (a regenerált fejek jelenléte úgy is megerősíthető, binokuláris mikroszkóp alatt ellenőrizzük a férgek egy reprezentatív részmintáját). A vizsgált organizmusok ezután várhatóan hasonló fiziológiai állapotban lesznek. Ez azt jelenti, hogy ha morphallaxis útján történő regeneráció következik be a szinkronizált férgekben a vizsgálat alatt, gyakorlatilag az összes állat várhatóan ugyanolyan mértékben lesz kitéve a szennyezett üledéknek. A szinkron férgeket akkor kell megetetni, amikor a férgek elkezdik beásni magukat a szubsztrátumba, vagy 7 nappal a kettémetszés után. Az etetési rendnek összehasonlíthatónak kell lennie a normál tenyészetekével, de tanácsos lehet a szinkron férgeket azzal a táplálékforrással etetni, amelyet a vizsgálathoz is használni kell. A férgeket vizsgálati hőmérsékleten, azaz 20 ± 2 °C-on kell tartani. A regeneráció után azokat a hasonló méretű, ép, teljes férgeket kell használni a vizsgálathoz, amelyek óvatos mechanikai inger hatására aktív úszást vagy mászást mutatnak. A férgek sérülését vagy autotómiáját meg kell akadályozni, pl. a férgek kezeléséhez tűzzel polírozott élű pipettát vagy rozsdamentes acél pálcikát használva.

Ha a *Lumbriculus variegatus* fajt használjuk a vizsgálatban, megfelelő körülmények esetén a férgek számának – a faj speciális szaporodási módja miatt – növekednie kell a vizsgálat során (6). A *L. variegatus* fajjal végzett biológiai felhalmozódási vizsgálatokban a reprodukció elmaradását fel kell jegyezni, és figyelembe kell venni a vizsgálati eredmények értelmezése során.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, Oligochaeta (körvizsgálatban nem validált)**

A *Branchiura sowerbyi* különböző típusú üledékkel rendelkező tározókban, tavakban és folyókban él, eredetileg a trópusi területeken. Az északi félteke meleg víztestjeiben is megtalálható. Sokkal nagyobb abundanciával fordul azonban elő nagy szervesanyag-tartalmú sáros-agyagos üledékekben. A férgek

▼M6

az üledékrétegben élnek. Általában még a férgek hátsó vége is be van ásva az üledékbe.. A faj könnyen beazonosítható a hátsó részén található kopoltyúszálak alapján. A felnőtt egyedek hossza elérheti a 9–11 cm-t, a nedves tömegük pedig a 40–50 mg-ot. A férgek magas szaporodási arányt mutatnak, a populáció az alábbiakban leírt hőmérsékleti és táplálási feltételek (Aston és mtsai, 1982., (65)) mellett kevesebb, mint 2 hét alatt megduplázódik. A *B. sowerbyi* fajt mind toxicitási, mind biológiai felhalmozódási vizsgálatokban használják (Marchese & Brinkhurst, 1996. (31), illetve Roghair és mtsai, 1996. (67)).

Tenyésztési módszerek

A *Branchiura sowerbyi* tenyésztési feltételeinek összefoglalója az alábbiakban található (Mercedes R. Marchese, INALI, Argentína és Carla J. Roghair, RIVM, Hollandia).

A vizsgálati organizmusok tenyésztéséhez különleges technikára nincs szükség. Az organizmusok nem szennyezett természetes üledék alkalmazásával tenyészthetők (31). A gyakorlati tapasztalatok azt mutatják, hogy a természetes üledékből és homokból álló közeg – a tiszta természetes üledékkel összehasonlítva – javítja a férgek állapotát (32) (67). A tenyésztéshez 3 literes főzőpohár használható, amely 1 500 ml üledék/víz közeget tartalmaz; a közeg 375 ml természetes szennyezetlen üledékből (körülbelül 10 % összes szerves szén; a részecskék körülbelül 17 %-a $\leq$ 63 μm), 375 ml tiszta homokból (M32), és 750 ml mesterséges vízből vagy klórtalanított csapvízből áll (31) (32) (67). Papírtörlőket is lehet használni tenyésztő szubsztrátumként, de abban a populáció növekedése alacsonyabb lesz, mint a természetes üledékben. Félstatikus rendszerekben az edényben lévő vízréteget lassan levegőztetni kell, a fedővizet pedig hetente meg kell újítani.

A kezdéskor minden főzőpohár 25 fiatal férget tartalmaz. Két hónap után csipesszel kiszedjük a nagy férgeket az üledékből és egy új főzőpohárba helyezzük át, amely frissen készült üledék/víz közeget tartalmaz. A régi főzőpohár bábokat és fiatal férgeket is tartalmaz. Ilyen módon főzőpoharanként akár 400 fiatal férget is lehet nyerni. A felnőtt férgeket legalább egy évig lehet szaporításra használni.

A tenyészeteket 21–25 °C hőmérsékleten kell tartani. A hőmérséklet ± 2 °C tartományon belül változhat. A pete lerakásától a báb fiatal férgek általi elhagyásáig tartó embrionális fejlődéshez 25 °C-on körülbelül három hét szükséges. A peterakás mértékét túlélő *B. sowerbyi* férgenként 6,36 (31) és 11,2 (30) között találták sárban és 25 °C-on. A peték bábonkénti száma 1,8–2,8 (66) (69), de akár 8 (68) is lehet.

Az oldott oxigént, a vízkeménységet, a hőmérsékletet és a pH-t hetente kell mérni. Hetente két vagy három alkalommal haleledel (pl. TetraMin®) adható szuszpenzióban, *ad libitum*. A férgeket *ad libitum* adott felolvasztott salátával is lehet etetni.

A faj legnagyobb előnye a magas egyedenkénti élőanyag-tömeg (akár 40–50 mg nedves tömeg példányonként). Ezért ez a faj radioaktív izotóppal nem jelölt vizsgált anyagok biológiai felhalmozódásának vizsgálatára is használható. Az expozíciót a *T. tubifex* vagy a *L. variegatus* esetében használt rendszerekben lehet elvégezni, ismétlésenként egyetlen példánnyal (11). Az ismétlések számát azonban meg kell emelni, kivéve, ha nagyobb vizsgálati kamrákat használunk (11). Az üledékbe ásó magatartással kapcsolatos érvényességi kritériumot is hozzá kell igazítani a fajhoz.

▼**M6**

SZAKIRODALOM

(1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(2) Európai Bizottság (EB) (2003). Az új bejelentett anyagok jelentette kockázatok értékeléséről szóló 93/67/EGK bizottsági irányelv, a létező anyagok jelentette kockázatok becsléséről szóló 1488/94/EK bizottsági rendelet és a biocid termékek forgalomba hozataláról szóló 98/8/EK európai parlamenti és tanácsi irányelv alkalmazását segítő, kockázatértékelésről szóló technikai útmutató; I–IV. rész Az Európai Közösségek Kiadóhivatala, Luxembourg.

(3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

(4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(5) E melléklet C.13. fejezete: Biokoncentráció vizsgálata: átfolyásos hal vizsgálat.

(6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(7) E melléklet C.27. fejezete, Üledékvizek árvaszúnyog életciklus toxicitási vizsgálata szennyezett üledék használatával.

(8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

(9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry 22: 872-885.

(10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes”, 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

(13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a Thalassia seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301-310.

▼M6

(14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim

(15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709-1725.

(16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443-1450.

(17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Wat. Res. 24, 1225-1231.

(18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501-1514.

(20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.

(22) E melléklet következő fejezetei:

A.4. fejezet: Gőznyomás

A.5. fejezet: Felületi feszültség

A.6. fejezet: Vízoldékonyság

A.8. fejezet: Megoszlási hányados, lombikrázásos módszer

A.24. fejezet: Megoszlási hányados, HPLC-módszer

C.7. fejezet: Lebomlás – Abiotikus lebomlás: hidrolízis a pH függvényében

C.4. fejezet, A-F: A gyors biológiai lebonthatóság meghatározása

C.19. fejezet: Adszorpciós együttható (K_{OC}) becslése talajon és szennyvíziszapon nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC).

C.29. fejezet: Gyors biológiai lebonthatóság, CO_2 légmentesen zárt edényekben

(23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paris.

(24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, 165-172.

▼M6

(25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for desribing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Wat. Res. 22, 701-707.

(28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm Tubifex tubifex. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061-1072.

(30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. Aquaculture 26, 155-160.

(31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. Hydrobiologia 334, 163-168.

(32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719102027.

(33) E melléklet C.1. fejezete: Akut toxicitás hal esetében.

(34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

(35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of Limnodrilus hoffmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. Tubifex tubifex (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

▼**M6**

(40) E melléklet C.8. fejezete: Toxicitás földigilisztákra.

(41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environ. Sci. Toxicol. 23, 588-595.

(43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): Aquatic Oligochaeta Biology, 175-184. Plenum Press, New York.

(44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.

(45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.

(46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. Chemosphere 32, 1897-1905.

(47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegatus. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

(48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10, 1431-1436.

(49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099-1105.

(50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.

(51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (Brachydanio rerio). Sci. Total Environment 109/110, 411-421

(54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische – Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.

(55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod Porcellio scaber. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

▼**M6**

(57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. Arch. Hydr. 63, 310-386.

(60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. Environ. Sci. Technol. 21, 785-790.

(61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47-67.

(62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 69-78.

(63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. Aquaculture 29, 137-145.

(67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge Chironomus riparius and the tubificid oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719101026.

(68) Aston, R.J. (1984). The culture of Branchiura sowerbyi (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. Aquaculture 40, 89-94.

(69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Tubificidae). Hydrobiologia, 278, 267-274.

▼M7

C.47. A HALAK KORAI ÉLETSZAKASZÁRA VONATKOZÓ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 210. vizsgálati iránymutatásában (2013) leírt módszerrel. A halak korai életszakaszára vonatkozó vizsgálatok célja a vegyi anyagok által a vizsgált fajokra és azok fejlődési szakaszaira gyakorolt letális és szubletális hatások meghatározása. A vizsgálatok értékes információkkal szolgálnak a vegyi anyagok által más halfajokra gyakorolt krónikus letális és szubletális hatások becsléséhez.

2. A 210. vizsgálati iránymutatás az Egyesült Királyság által benyújtott javaslaton alapul, amelyet az OECD szakértőinek Medmenhamben (Egyesült Királyság) 1988 novemberében tartott ülésén vitattak meg és 2013-ban aktualizáltak annak érdekében, hogy a dokumentumba beépítsék a vizsgálat alkalmazása során szerzett tapasztalatokat és a halakon végzett toxicitásvizsgálatokról szóló, 2010 szeptemberében tartott OECD-munkaértekezlet javaslatait (1).

A VIZSGÁLAT ELVE

3. A korai életszakaszban lévő halak a vízben oldott vizsgálati vegyi anyag széles tartományon belüli koncentrációinak vannak kitéve. Átfolyásos körülmények javasoltak; amennyiben ez nem megoldható, úgy félstatikus feltételek is elfogadhatók. A részletekért „A nehezen vizsgálható anyagok és keverékek vízi toxikológiai vizsgálata” című OECD-iránymutatást (2) kell tanulmányozni. A vizsgálat azzal kezdődik, hogy frissen megtermékenyített petéket vizsgálati kamrákba helyeznek, és a vizsgálatot az adott fajtól függően annyi ideig folytatják, amennyi ahhoz szükséges, hogy a kontrollhal növendékké fejlődjön. A letális és szubletális hatásokat kiértékelik, és összehasonlítják a kontrollcsoportbeli értékekkel a megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC) meghatározása érdekében, hogy meg lehessen állapítani i. a megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációt (NOEC) és/vagy ii. az ECx (pl. EC10, EC20) értéket regressziós modell segítségével azon becsült koncentrációt, amely a mért hatásban x % változást okozna. A releváns hatásos koncentrációk és paraméterek jelentése a szabályozási kerettől függhet. Az ECx értékének a vizsgálati koncentrációk által meghatározott tartományon belül kell elhelyezkednie annak érdekében, hogy az ECx értékét extrapoláció helyett interpolációval lehessen meghatározni (a fogalommeghatározásokat lásd az 1. függelékben).

A VIZSGÁLATI VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

4. A vizsgálati vegyi anyag a vizsgálat tárgyát képező anyag. Ismerni kell a vizsgálati vegyi anyag vízoldékonyságát (lásd e melléklet A.6. fejezetét) és gőznyomását (lásd e melléklet A.4. fejezetét), és a vizsgálati oldatokban lévő vegyi anyag mennyiségi meghatározásához rendelkezni kell olyan megbízható analitikai módszerrel, amelynek pontossága és a meghatározási határai ismertek és dokumentáltak. A lehetőleg e vizsgálat céljára kiválasztott fajokkal korábban már elvégzett akut toxicitási vizsgálatok eredményei (lásd e melléklet C.1. és C.49. fejezetét) a vizsgálat lefolytatásához nem szükségesek, ugyanakkor hasznos információkkal szolgálhatnak.

5. Ha a vizsgálati módszert keverék vizsgálatára alkalmazzák, annak összetételét a lehető legpontosabban kell jellemezni, pl. az alkotóelemeinek kémiai azonosítójával, azok mennyiségi előfordulásával, továbbá (pl. a fent említett) anyagspecifikus tulajdonságaival. A vizsgálati módszernek adott keverék szabályozási célú vizsgálatára történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az megfelelő eredményeket biztosíthat-e a szándékolt szabályozási célra.

6. A hasznos információk közé tartozik még a szerkezeti képlet, az anyag tisztasága, vízoldékonysága, vízben és fény hatására tanúsított stabilitása, a pK_a- és P_{ow}-értékek, valamint a gyors biológiai lebonthatóságra vonatkozó vizsgálatok eredményei is (lásd e melléklet C.4. és C.29. fejezetét).

▼M7

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

7. A vizsgálat érvényességéhez a következő feltételeknek kell teljesülniük:

— a kísérlet során az oldott oxigén koncentrációját mindvégig a levegőtelítettségi érték 60 %-a felett kell tartani,

— a víz hőmérséklete a vizsgálat során a vizsgálati kamrák, illetve bármelyik két egymást követő nap között ±1,5 °C-nál nagyobb mértékben nem térhet el, és a hőmérsékletet a vizsgálati fajra nézve meghatározott hőmérséklet-tartományon belül kell tartani (2. függelék);

— a vizsgálati koncentráció analitikai mérése kötelező;

— a kontrollcsoportokban és – ahol ez releváns – az oldószeres kontrollokban a megtermékenyített peték összesített túlélési arányszámainak és a kikelést követő életképességük arányának a 2. függelékben meghatározott határértékeknél nagyobbnak vagy azzal egyenlőnek kell lenniük.

8. Amennyiben az érvényességi kritériumokhoz képest csekély eltérés figyelhető meg, a következményeket a vizsgálati adatok megbízhatóságának tükrében mérlegelni kell és ezeket a megfontolásokat a jelentésben fel kell tüntetni. Az oldószeres kontrollban előforduló túlélésre, kikelésre vagy növekedésre gyakorolt hatásokat a negatív kontrollal összehasonlítva kell jelenteni, és a vizsgálati adatok megbízhatóságának tükrében kell értékelni.

A MÓDSZER ISMERTETÉSE

Vizsgálati kamrák

9. Üvegből, rozsdamentes acélból vagy más, kémiailag semleges anyagból készült edényeket lehet használni. Mint ismeretes a szilikon a lipofil anyagokat erősen abszorbeálja, ezért a szilikon csövek átfolyásos vizsgálatokhoz való használatát és a vízzel érintkező szilikon tömítések alkalmazását pl. monoblokkos üvegakváriumok használatával minimálisra kell csökkenteni. Az edényeknek elég nagynak kell lenniük ahhoz, hogy lehetővé tegyék a kontrollok megfelelő növekedését, az oldott oxigén koncentrációjának fenntartását (pl. kisebb halfajok esetében egy 7 literes tartály elegendő) és a 19. pontban a betelepítési arányra vonatkozóan megadott kritériumok teljesítését. Tanácsos a vizsgálati kamrák véletlenszerű elhelyezése a vizsgálatra kijelölt területen. A teljesen véletlenszerű elrendezéssel szemben célszerűbb a véletlen blokk elrendezés alkalmazása, ahol mindegyik blokkban mindegyik kezelési mód képviselt. A vizsgálati kamrákat védeni kell a nem kívánt zavaró hatásoktól. A vizsgálati rendszert lehetőleg annyi ideig kell a vizsgálati vegyi anyag koncentrációival kondicionálni, amely elegendő ahhoz, hogy a vizsgált élőlények elhelyezése előtt stabil expozíciós koncentrációt lehessen kimutatni.

Az állatfaj kiválasztása

10. A vizsgálat céljaira javasolt halfajok listáját az 1. táblázat tartalmazza. Ez nem zárja ki más fajok használatát, de az eljárást ekkor a megfelelő vizsgálati feltételek biztosítása érdekében esetleg módosítani kell. A fajok és a kísérleti módszer megválasztásának indoklását fel kell tüntetni a jelentésben.

A tenyészhalak tartása

11. A tenyészállomány megfelelő feltételek melletti tartására vonatkozó részletek a 3. függelékben és a (3) (4) (5) hivatkozásban találhatók.

A megtermékenyített peték, embriók és lárvák kezelése

12. A megtermékenyített petéket, embriókat és lárvákat kezdetben a fő tartályon belül elhelyezett, oldalaiknál vagy végeiknél hálós, üvegből vagy rozsdamentes acélból készült kisebb edényekben lehet kitenni a tartályon átfolyó

▼M7

vizsgálati oldatnak. E kisebb edényekben a turbulenciamentes áramlást úgy lehet elérni, hogy az edényeket fel-le mozgatható karra függesztik fel, ügyelve, hogy az élőlények mindig a vizsgálati oldatban legyenek. Lazacfélék megtermékenyített petéit olyan rácsokon vagy hálókon lehet tartani, amelyek nyílásai elég nagyok ahhoz, hogy a petékből kibújó lárvák átessenek rajtuk.

13. Amennyiben a peték fő kísérleti tartályon belüli tartására kis tartályokat, rácsokat vagy hálókat használnak, akkor a lárvák kikelése után ezeket a visszatartó eszközöket – a 3. függelékben található útmutatás szerint – el kell távolítani, kivéve, ha a lárvák szökésének megakadályozása érdekében van rájuk szükség. Amennyiben a lárvákat át kell helyezni, azokat nem szabad kitenni a levegő hatásának, és nem szabad hálót használni a lárváknak a peték tárolására használt tartályból való kiemelésére. Az ilyen áthelyezés időzítése az egyes fajoktól függően változik, és azt a jegyzőkönyvben dokumentálni kell. Az áthelyezés azonban nem mindig szükséges.

Víz

14. A vizsgálat céljára bármilyen víz felhasználható, amelyben a vizsgálati fajok kellően hosszú ideig túlélik a vizsgálati körülményeket és növekednek (lásd a 4. függeléket). A víz minőségét a vizsgálat során mindvégig azonos szinten kell tartani. Annak biztosítására, hogy a hígítóvíz ne gyakoroljon nem kívánt hatást a vizsgálat eredményeire (pl. mert komplexet képez a vizsgálati vegyi anyaggal), illetve ne gyakoroljon kedvezőtlen hatásokat a tenyészállomány teljesítményére, időnként mintákat kell venni elemzésre. Mérni kell a következőket: a nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd és Ni), a fontosabb anionok és kationok (pl. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), az ammónia, az összes klórtartalmú növényvédőszer-maradék, a teljes szervesszén-tartalom és a szuszpendált szilárd anyagok, például félévente, amennyiben a hígítóvízről tudott, hogy viszonylag állandó minőségű. Amennyiben ismert, hogy a víz változó minőségű, úgy a méréseket gyakrabban kell elvégezni; a gyakoriság attól függ, hogy a víz minősége mennyire változó. Az elfogadható minőségű hígítóvíz néhány kémiai tulajdonságának felsorolása a 4. függelékben található.

Vizsgálati oldatok

15. Az átfolyásos vizsgálatok céljára olyan rendszert kell használni, amely folyamatosan adagolja és hígítja a vizsgálati vegyi anyag törzsoldatát (pl. adagolószivattyú, proporcionális hígító vagy telítőrendszer), annak érdekében, hogy a vizsgálati kamrához eljusson a koncentrációk sorozata. A kísérlet során időnként ellenőrizni kell a törzsoldatok és a hígítóvíz áramlási sebességét, amelynek értéke a vizsgálat során nem változhat 10 %-nál nagyobb mértékben. A 24 óránként legalább öt vizsgálati kamrányi vízcserének megfelelő áramlási sebességet találták megfelelőnek (3). A 19. pontban előírt betelepítési arány követése esetén azonban alacsonyabb, pl. 2–3 vizsgálati kamrányi vízcserének megfelelő áramlási sebesség is alkalmazható, hogy megakadályozzák a táplálék gyors eltávozását.

16. A kiválasztott koncentrációjú vizsgálati oldatok a törzsoldat hígításával készíthetők el. A törzsoldatot lehetőleg a vizsgálati vegyi anyagnak a hígítóvízbe, mechanikai eszközök (pl. keverő és/vagy ultrahang) segítségével történő bekeverésével vagy megmozgatásával kell elkészíteni. Telítési oszlopok (oldhatósági oszlopok) vagy passzív adagolási módszerek (6) is alkalmazhatók a megfelelő koncentrációjú törzsoldat elkészítéséhez. Oldószer-hordozóanyag használata nem ajánlott. Abban az esetben azonban, ha oldószerre van szükség, párhuzamosan egy oldószeres kontrollt is futtatni kell a vegyi anyaggal történő kezelésekben alkalmazottal megegyező oldószer-koncentrációval; vagyis az oldószer szintjének azonosnak kell lennie minden koncentrációban és az oldószeres kontrollban. Néhány hígítási rendszer esetében ez esetleg technikailag nehezen kivitelezhető; ebben az esetben az oldószer koncentrációjának az oldószeres kontrollban a kezelt csoportokban lévő legnagyobb oldószer-koncentrációval kell megegyeznie. A nehezen vizsgálható anyagok esetében „A nehezen vizsgálható anyagok és

▼M7

keverékek vízi toxikológiai vizsgálata” című, 23. számú OECD-iránymutatást (2) kell tanulmányozni. Oldószer használata esetén a megfelelő oldószert az anyag kémiai tulajdonságai határozzák meg. A 23. számú OECD-iránymutatás 100 μl/l maximális koncentrációt ajánl. Annak érdekében, hogy elkerülhető legyen az oldószer esetleges hatása a mért végpontokra (7), az oldószer koncentrációját a lehető legalacsonyabb szinten javasolt tartani.

17. Félstatikus vizsgálatok során két különböző vízcsere-módszer közül lehet választani: új vizsgálati oldatokat kell készíteni tiszta edényekben és a kísérlet korábbi fázisait túlélő petéket és lárvákat kíméletesen át kell telepíteni az új edényekbe, vagy az élőlényeket a vizsgálati edényben kell tartani, miközben a vizsgálati oldat/kontroll mennyiségének egy részét (legalább kétharmadát) le kell cserélni.

ELJÁRÁS

Az expozíció körülményei

Időtartam

18. A vizsgálatokat a peték megtermékenyítését követően a lehető legrövidebb időn belül el kell kezdeni, és a megtermékenyített petéket lehetőleg a csírakorong osztódásának kezdete előtt, vagy e fázist követően mihamarabb a vizsgálati oldatba kell helyezni. A vizsgálat időtartama a használt fajtól függ. Néhány javasolt időtartam a 2. függelékben található.

Betelepítés

19. A vizsgálat kezdetén használt megtermékenyített peték számának elegendőnek kell lennie a statisztikai követelmények kielégítéséhez. A petéket véletlenszerűen kell elosztani a különböző kezelési módok között, és koncentrációszintenként legalább 80, legkevesebb négy párhuzamos edény között egyenletesen elosztott, megtermékenyített petét kell behelyezni. A betelepítési aránynak (a vizsgálati oldat egységnyi térfogatára jutó biomaszsza) megfelelően alacsonynak kell lennie, hogy a pete és lárva fejlődési fázisokban az oldottoxigén-koncentrációt külön levegőztetés nélkül is a levegőtelítettségi érték legalább 60 %-ának megfelelő szinten lehessen tartani. Átfolyásos vizsgálatok esetében 24 órára számítottan 0,5 g/liter nedves tömegnél, illetve bármely időpontban 5 g/liter oldatnál nem magasabb betelepítési arány tartása javasolt (3).

Fény és hőmérséklet

20. A megvilágítási időszakokat és a víz hőmérsékletét a vizsgálati fajok sajátosságaihoz kell igazítani (lásd a 2. függeléket).

Etetés

21. A táplálék és az etetés rendkívül fontos, és elengedhetetlen, hogy az egyes életszakaszokban a megfelelő táplálékot a megfelelő időponttól kezdve a normális fejlődéshez szükséges mennyiségben adják. A táplálék mennyiségének az egyes párhuzamos vizsgálatokban megközelítőleg azonosnak kell lennie, kivéve ha azt a mortalitási arány figyelembevételével ki kell igazítani. A táplálékfelesleget és az ürüléket szükség szerint el kell távolítani a hulladékok felhalmozódásának elkerülése érdekében. Az etetési rend részletei a 3. függelékben találhatók, azonban a tapasztalatok birtokában a táplálékot és az etetési rendet a túlélési arány növelése és a fejlődés optimalizálása érdekében folyamatosan tökéletesítik. Az élő táplálék a környezetgazdagítás egyik forrása, ezért azt – fajtól és életszakasztól függően – a száraz vagy fagyasztott táp helyett vagy mellett ajánlott adni.

Vizsgálati koncentrációk

22. A vizsgálati vegyi anyagból általában – koncentrációnként minimum négy replikátummal – ötféle, legfeljebb 3,2 konstans szorzótényezővel különböző koncentráció használata szükséges. A vizsgálati koncentrációk tartományának kiválasztásakor célszerű mérlegelni a lehetőleg ugyanazokon a fajokon végzett akut vizsgálatokra és/vagy dózisbehatároló vizsgálatokra vonatkozó információkat (1), amennyiben azok rendelkezésre állnak. A vizsgálati koncentrációk tartományának kiválasztásakor viszont minden információforrást figyelembe kell venni, többek között a kereszthivatkozásokat, illetve a halembriókon végzett akut toxicitásvizsgálatokra vonatkozó adatokat. Egy határérték-vizsgálat vagy kiterjesztett határérték-vizsgálat ötnél

▼M7

kevesebb koncentrációval akkor fogadható el meghatározó vizsgálatként, ha csak az empirikus NOEC szintjét kell meghatározni. Ötnél kevesebb vizsgálati koncentráció használatát indokolni kell. Nem szükséges vizsgálni a vizsgálati vegyi anyag koncentrációját a 96 órás LC_{50}-nél vagy (amennyiben alacsonyabb) a 10 mg/l értéknél magasabb értékek esetében.

Kontrollok

23. A vizsgálati vegyi anyag koncentrációsorozataival párhuzamosan hígítóvizes kontrollt és szükség esetén kizárólag az oldószer-hordozóanyagot tartalmazó oldószeres kontrollt is le kell futtatni (lásd a 16. pontot).

Az analitikai meghatározások és mérések gyakorisága

24. Az expozíciós időszak megkezdése előtt (például a vizsgálati koncentrációk mérésével) gondoskodni kell arról, hogy a vegyi anyagot adagoló rendszer minden párhuzamos esetében megfelelően működjön. Meg kell állapítani a szükséges analitikai módszereket, ideértve a megfelelő meghatározási határt (LOQ), és az anyag vizsgálati rendszerben való stabilitásáról megfelelő ismereteket kell szerezni. A vizsgálat során a vizsgálati vegyi anyag koncentrációit az expozíció jellemzése érdekében rendszeres időközönként meg kell határozni. Legalább öt meghatározás szükséges. Átfolyásos rendszerek esetében a vizsgálati vegyi anyag analitikai mérését koncentrációnként egy párhuzamoson legalább hetente egyszer kell elvégezni, felváltva vizsgálva az egyes párhuzamosokat. A további analitikai meghatározások gyakran javítják a vizsgálatok eredményének minőségét. A szemcsés anyagok eltávolítása érdekében szükség lehet a minták szűrésére (pl. egy 0,45 μm pórusméretű szűrőbetét használatával) vagy centrifugálására annak biztosítására, hogy a meghatározások valódi oldatban lévő vegyi anyagra vonatkozzanak. A vizsgálati vegyi anyag adszorpciójának csökkentése érdekében a szűrőket a felhasználásuk előtt telíteni kell. Amennyiben a mért koncentrációértékek nem maradnak a névleges koncentrációérték 80–120 %-án belül, úgy a hatásos koncentrációkat átfolyásos vizsgálatok esetében a számtani átlaghoz viszonyítva kell meghatározni és kifejezni (lásd a C.20 vizsgálati módszer 6. függelékében a számtani átlag kiszámítását (8)), félstatikus vizsgálatok esetében pedig a mért koncentrációk mértani átlagához viszonyítva kell kifejezni (lásd „A nehezen vizsgálható anyagok és keverékek vízi toxikológiai vizsgálata” című, OECD-iránymutatás 5. fejezetét (2)).

25. A vizsgálat során minden vizsgálati edényben legalább hetente egyszer meg kell mérni az oldott oxigén koncentrációját, a pH-t és a hőmérsékletet, valamint indokolt esetben a sótartalmat és a keménységet a vizsgálat elején és végén. A hőmérsékletet legalább egy vizsgálati edényben folyamatosan figyelemmel kell kísérni.

Megfigyelések

26. **Az embrionális fejlődés fázisa**: a vizsgálati vegyi anyag hatásának való expozíció kezdetén az embrionális fejlődési fázis azonosítását a lehető legpontosabban kell elvégezni. Erre a megfelelően tartósított és megtisztított peték egy reprezentatív mintája használható.

27. **A peték kikelése és túlélése**: A kikelés és túlélés folyamatait naponta egyszer meg kell figyelni, és a tapasztalt számadatokat fel kell jegyezni. Amennyiben az embrionális fejlődési fázisban (pl. a vizsgálat első vagy második napján) gombaképződés figyelhető meg a petéken, úgy az érintett petéket meg kell számlálni és el kell távolítani. Az elpusztult embriókat, lárvákat és növendék halakat észlelésükkor azonnal el kell távolítani, mert gyorsan bomlásnak indulnak és a többi hal mozgásának hatására széteshetnek. Az elhullott egyedek kiemelésekor különös gondot kell fordítani arra, hogy a szomszédos embriók/lárvák nehogy fizikailag sérüljenek. Az elhullás jelei a fajtól és az életciklus szakaszától függően változnak. Például:

▼M7

— megtermékenyített peték: különösen a korai szakaszokban az áttetszőség jelentős csökkenése és színbeli elváltozás, amit a fehérjék koagulációja és/vagy kicsapódása okoz, ami fehér opálos színt eredményez,

— embriók, lárvák és növendék halak: mozdulatlanság és/vagy a légzőmozgások és/vagy a szívverés hiánya és/vagy reakció elmaradása fizikai ingerekre.

28. **Rendellenes külső megjelenés**: a vizsgálat időtartamától és a leírt rendellenesség jellegétől függően megfelelő időközönként fel kell jegyezni a rendellenes testformájú lárvák vagy növendék halak számát. Meg kell jegyezni, hogy rendellenesen fejlődött lárvák és növendék halak természetes körülmények között is előfordulnak, és egyes fajok esetében a kontrollcsoport(ok)ban mennyiségük akár több százalékot is elérhet. Amennyiben a deformitás és az ezzel összefüggő rendellenes viselkedés olyan súlyosnak tekinthető, hogy az az élőlény számára már jelentős szenvedést okoz, és elérte azt a pontot, amikor a felépülés már nem lehetséges, úgy az érintett egyedet el lehet távolítani a vizsgálatból. Az ilyen állatokon eutanáziát kell végrehajtani, és a további adatelemzés szempontjából mortalitásként kell kezelni. E vizsgálati módszer tekintetében ajánlott legtöbb faj esetében normális embrionális fejlődést dokumentáltak (9) (10) (11) (12).

29. **Rendellenes viselkedés**: a rendellenes viselkedésmódokat – pl. hiperventiláció, koordinálatlan úszásmód, a fajra nem jellemző nyugalom és a fajra nem jellemző táplálkozási mód – a vizsgálat teljes időtartamától függő időközönként (például a melegvízi halfajok esetében naponta egyszer) fel kell jegyezni. Bár e hatásokat nehéz számszerűsíteni, ha megfigyelhetők, akkor segíthetnek a mortalitási adatok értelmezésében.

30. **Tömeg**: a vizsgálat végén az összes életben maradt halat le kell mérni legalább párhuzamosonként (feljegyezve a párhuzamosban szereplő állatok számát és az egyes állatok átlagos tömegét): lehetőség szerint a halak nedves (itatóspapírral szárított) tömegét kell jelentésbe foglalni, de a száraz tömeg is elfogadható (13).

31. **Hosszúság**: a kísérlet végén le kell mérni az egyedi hosszúságokat. Ajánlott a teljes hossz mérése, ugyanakkor, ha a farokuszonyon rothadás vagy kimaródás, pusztulás jelei fordulnak elő, akkor a standard hosszt lehet használni. Egy adott vizsgálatban szereplő valamennyi hal esetében ugyanazt a módszert kell alkalmazni. Az egyedi hosszúságot például tolómérővel, digitális fényképezőgéppel vagy kalibrált okulár-mikrométerrel lehet mérni. A jellemző minimális hosszúságok meghatározása a 2. függelékben található.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az eredmények feldolgozása

32. Ajánlatos a kísérletet úgy kialakítani és olyan statisztikai vizsgálatot választani, hogy a biológiai szempontból fontos változásokat az olyan végpontokon, ahol megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációt kell jelenteni, megfelelő (80 %-os vagy ennél nagyobb) statisztikai erővel lehessen észlelni. A releváns hatásos koncentrációk és paraméterek jegyzőkönyvezése a szabályozási kerettől függhet. Amennyiben EC_x értéket kell jelenteni, úgy a kísérleti tervek és a regressziós modell kiválasztásának lehetővé kell tennie az EC_x érték becslését úgy, hogy i. az EC_x 95 %-os konfidencia-intervalluma ne tartalmazzon nullát és ne legyen túl tág, ii. az EC_x-nél várható átlag 95 %-os konfidencia-intervalluma ne tartalmazza a kontroll átlagát és iii. a regressziós modell viszonylag jól illeszkedjen az adatokhoz. Bármelyik megközelítés esetében meg kell határozni a százalékos változást minden egyes végponton, amelyet fontos kimutatni vagy megbecsülni. A vizsgálatot úgy kell kialakítani, hogy ez megoldható legyen. Amennyiben az EC_x-érték meghatározásának fenti feltételei nem teljesülnek, az NOEC-megközelítést kell alkalmazni. Nem valószínű, hogy a százalékos változás minden végponton megegyezik, és az sem valószínű, hogy olyan megvalósítható kísérletet lehet tervezni, amely minden végpont tekintetében megfelel a fenti feltételeknek, tehát a kísérlet megfelelő kialakítása során azokra a végpontokra kell

▼M7

összpontosítani, amelyek az adott kísérlet szempontjából lényegesek. Az 5. és 6. függelék minden egyes megközelítésre vonatkozóan tartalmaz statisztikai folyamatábrákat és útmutatást, amelyek segítséget nyújtanak az adatok kezeléséhez, valamint a legmegfelelőbb statisztikai vizsgálat vagy modell kiválasztásához. Alkalmazhatók más statisztikai megközelítések is, amennyiben azok használata tudományos szempontból indokolt.

33. Szükséges a párhuzamos eredmények közti eltérések varianciaanalízissel vagy kontingenciatáblázatos módszerrel való elemzése, és az elemzés alapján a megfelelő statisztikai elemző módszerek alkalmazása. Az egyedi koncentrációszintek és a kontrollcsoport szintjei esetében kapott eredmények közötti többszörös összehasonlítás érdekében a lefelé lépegető Jonckheere–Terpstra-féle próba vagy a Williams-féle próba elvégzése javasolt folytonos válaszok esetében, és a lefelé lépegető Cochran–Armitage-féle próba alkalmazása javasolt diszkrét válaszok esetében, amelyek monoton koncentráció-válasznak felelnek meg és az „extra-binomiális” varianciára nincs bizonyíték (14). Amennyiben az „extra-binomiális” variancia igazolható, a Cochran–Armitage-féle próba Rao–Scott-féle módosítása javasolt (15) (16), illetve a Williams- vagy a Dunnett-féle próba (négyzetgyök arkusz-szinusz transzformáció után) vagy a Jonckheere–Terpstra-féle próba a párhuzamosok arányaira. Amennyiben az adatok nem monoton koncentráció-válasznak felelnek meg, folytonos válaszok esetében a Dunnett- vagy a Dunn- vagy a Mann–Whitney-féle módszer bizonyulhat hasznosnak, diszkrét válaszok tekintetében pedig a Fisher-egzakt teszt (14) (17) (18). Bármely statisztikai módszer vagy modell alkalmazása során figyelmet kell fordítani arra, hogy a módszer vagy modell követelményei teljesüljenek (pl. a kísérlet megtervezésekor és a vizsgálat vagy modell alkalmazásakor meg kell becsülni és számításba kell venni a kamránkénti variabilitást). Az adatokat a normális eloszlás szempontjából értékelni kell, és az 5. függelék iránymutatást ad arra vonatkozóan, hogy az ANOVA reziduálisaival mi a teendő. A 6. függelék a regressziós megközelítés további megfontolásait tárgyalja. A statisztikai vizsgálatok követelményeinek való megfelelés érdekében transzformációkra lehet szükség. A regressziós modellek illesztése során végzett transzformációknál körültekintéssel kell eljárni, hiszen megeshet, hogy a nem transzformált adatokban megmutatkozó 25 %-os változás nem felel meg a transzformált adatokban megjelenő 25 %-os változásnak. Minden elemzés esetében a vizsgálati kamra és nem a halegyed az elemzési egység és a kísérleti egység, és ezt a hipotézisvizsgálatnak és a regressziónak is tükröznie kell (3) (14) (19) (20).

Vizsgálati jegyzőkönyv

34. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-név, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonossága stb. (ideértve adott esetben a szervesszén-tartalmat).

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyire részletesen lehetséges, az összetevőknek például a kémiai azonosítója (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai révén való jellemzés.

Vizsgálati fajok:

— tudományos név, törzs, származás és a megtermékenyített peték begyűjtésének módja, valamint a későbbi kezelés.

▼M7

Vizsgálati körülmények:

— alkalmazott vizsgálati eljárás (például félstatikus vagy átfolyásos, betelepítés);

— megvilágítási időszak(ok);

— vizsgálati elrendezés (pl. a vizsgálati kamrák és a párhuzamosok száma, a peték száma párhuzamosonként, a vizsgálati kamrák anyaga és mérete (magasság, szélesség, térfogat), víztérfogat vizsgálati kamránként);

— a törzsoldat elkészítésének módszere és a vízcsere gyakorisága (az esetleg használt diszpergálószer nevét és koncentrációját meg kell adni);

— a vizsgálati vegyi anyag adagolásának módszere (például szivattyú, hígítási rendszerek);

— a módszer visszanyerési hatékonysága és a névleges vizsgálati koncentrációk, a meghatározási határ, a mért értékek átlaga és szórása a vizsgálati edényekben, az ilyen adatok megszerzésének módszerei és bizonyítékok annak alátámasztására, hogy a mérések a valódi oldatban lévő vizsgálati vegyi anyag koncentrációszintjeire vonatkoznak,

— a hígítóvíz jellemzői: pH-érték, keménység, hőmérséklet, oldottoxigén-koncentráció, maradékklór-tartalom (amennyiben mérik), teljes szerves-szén-tartalom (amennyiben mérik), szuszpendált szilárd anyagok (amennyiben mérik), a vizsgálati közeg sótartalma (amennyiben mérik) és bármely más mérési adat;

— vízminőség a vizsgálati edényekben: pH-érték, keménység, hőmérséklet és az oldottoxigén-koncentráció;

— részletes információk a táplálékról (pl. a haltáp típusa, eredete, az adagolt mennyiség és az adagolás gyakorisága).

A következő végpontokra vonatkozóan egyedileg (vagy párhuzamosonként) dokumentált eredmények, azok átlaga, valamint adott esetben a variációs koefficiens:

— annak bizonyítása, hogy a kontrollok megfelelnek a vizsgálati fajok teljes túlélési elfogadhatósági normáinak (lásd 2. függelék);

— az egyes fejlődési fázisok (embrió, lárva és növendék hal) mortalitására és az összesített mortalitásra vonatkozó adatok;

— a kikelésig eltelt napok és a kikelt lárvák száma naponta, és a kikelés végének időpontja;

— az egészséges halak száma a vizsgálat végén;

— a túlélő állatok hosszára (standard vagy teljes hossz megadása) és tömegére vonatkozó adatok;

— az esetleges morfológiai rendellenességek előfordulása, jellemzése és száma;

— az esetleges viselkedésbeli eltérések előfordulása, leírása és száma;

— a statisztikai elemzés során alkalmazott megközelítés (regressziós analízis vagy varianciaanalízis) és az adatok feldolgozása (az alkalmazott statisztikai vizsgálat vagy modell);

— megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve (NOEC);

▼M7

— a megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (p = 0,05-nél) minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve (LOEC);

— EC_x adott esetben minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve, konfidencia-intervallumok (például 90 vagy 95 %) és a számításhoz használt illesztett modell grafikonja, a koncentráció–hatás görbe meredeksége, a regressziós modell egyenlete, a modell becsült paraméterei és a becslés standard hibái.

A vizsgálati módszertől való bármely eltérés.

Az eredmények tárgyalása, ideértve a vizsgálati módszertől való eltérésnek a vizsgálat eredményére gyakorolt esetleges hatását.

1. táblázat

Vizsgálathoz ajánlott halfajok

ÉDESVÍZI	TORKOLATI és TENGERI
Oncorhynchus mykiss Szivárványos pisztráng	*Cyprinodon variegatus* Tarka fogasponty
Pimephales promelas Amerikai cselle	*Menidia* sp. Atlanti ezüstösoldalú hal
Danio rerio Zebradánió	
Oryzias latipes Japán rizshal vagy Medaka	

SZAKIRODALOM

(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 LifeStage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 124188. 26 pp.

(4) Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA660/375011, Duluth, Minnesota.

(5) Brungs, W.A. and B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA600/377061, Duluth, Minnesota.

(6) Adolfsson-Erici, *et al*. (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593-599.

(7) Hutchinson, T.H. *et al*. (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.

(8) Chapter C.20 of this Annex, *Daphnia magna* Reproduction Test.

(9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (Cyprindon variegatus) for lifecycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.

(10) Kimmel, H. B.*et al*. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

▼**M7**

(11) Gonzalez-Doncel, M. *et al* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthydae) Journal of Applied Ichthyology, 20:1–14.

(12) Devlin, E.W. *et al*. (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, Pimephales promelas Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C..

(13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, Environmental Toxicology and Chemistry 31; 2, 370 – 376.

(14) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

(15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

(16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

(17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of Ameican Statistical Association, 50, 10961121.

(18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

(20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼M7

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

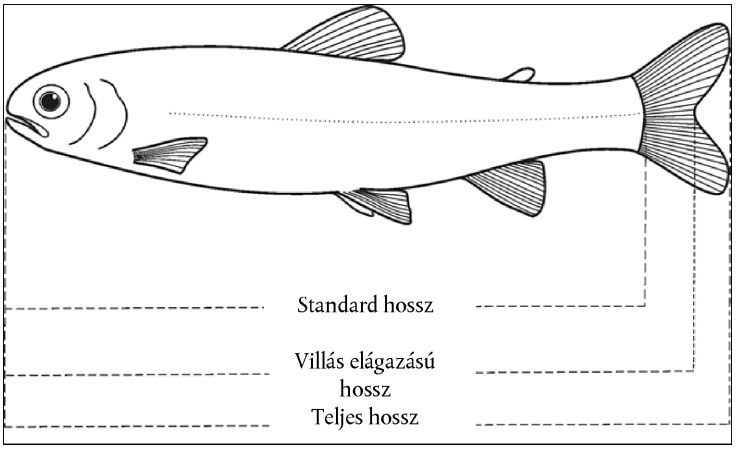
A farok tövéig mért hossz: az orrcsúcs és a farokúszó középső sugarának végpontja közötti távolság, és olyan halak esetében alkalmazandó, amelyeknél nehéz meghatározni, hogy a gerincoszlop hol ér véget (www.fishbase.org)

Standard hossz: az orrcsúcstól az utolsó csigolya poszterior végéig vagy a hipurális lemez mediolaterális részének poszterior végéig mért távolság. Leegyszerűsítve ez a mérés nem tartalmazza a farokúszó hosszát. (www.fishbase.org)

Teljes hossz: az orrcsúcs és a farokúszó hosszabbik lebenyének csúcsa közötti távolság, amelyet általában a lebenyek középvonal mentén való összenyomásával mérnek. Ez egy egyenes vonalú mérés, nem követi a test görbületét (www.fishbase.org)

1. ábra

A használt különböző hosszúságok leírása



Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

EC_x (hatásos koncentráció x % hatás eléréséhez): az a koncentráció, amely valamely hatás x %-át okozza a vizsgálati szervezetekben egy adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva. Például az EC_{50} az a becsült koncentráció, amely a vizsgálat valamilyen végpontja tekintetében a kitett populáció 50 %-ában okoz hatást a meghatározott expozíciós idő alatt.

Megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC): a vizsgálati vegyi anyag azon legalacsonyabb vizsgálati koncentrációja, amelynél a kontrollal összevetve még megfigyelhető a vegyi anyag statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$). Azonban az LOEC-szint feletti valamennyi vizsgálati koncentrációnak olyan ártalmas hatást kell kifejtenie, amely legalább egyenlő az LOEC-szinten megfigyelttel vagy súlyosabb annál. Amennyiben e két feltétel nem teljesíthető, akkor kimerítő magyarázatot kell adni arra, hogy hogyan történt az LOEC (és ennélfogva az NOEC) kiválasztása. Az 5. és 6. függelék útmutatást ad.

Megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC): a közvetlenül az LOEC alatti vizsgálati koncentráció, amely – a kontrollcsoporttal való összevetésben – nem fejt ki statisztikailag szignifikáns hatást ($p < 0,05$) a meghatározott expozíciós időszak alatt.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyag.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Elméleti és Alkalmazott Kémia Nemzetközi Uniója).

SMILES: molekulák egyszerűsített egy sorban történő beviteli rendszere

▼M7

2. függelék

VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEK, IDŐTARTAM ÉS A JAVASOLT FAJOK TÚLÉLÉSI KRITÉRIUMAI

FAJ	VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEK			A VIZSGÁLAT JAVASOLT IDŐTARTAMA	A kontrollhalak vizsgálat végén mért jellemző minimális átlagos teljes hossza (mm) (1)	A KONTROLLCSOPORT TÚLÉLÉSI ARÁNYA (minimum)	
	Hőmérséklet (°C)	Sótartalom ($^0/_{00}$)	Megvilágítás (óra)			Kikelés sikeressége	Kikelést követő életképesség
Édesvíz:							
Oncorhynchus mykiss Szivárványos pisztráng	10 ± 1,5 (2)		12 – 16 (3)	2 hét azt követően, hogy a kontrollok szabadon táplálkoznak (vagy 60 nap a kikelést követően)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas Amerikai cselle	25 ± 1,5		16	a vizsgálat kezdetét követően 32 nap (vagy a kikelést követően 28 nap)	18	70 %	75 %
Danio rerio Zebradánió	26 ± 1,5		12 – 16 (4)	a kikelést követően 30 nap	11	70 %	75 %
Oryzias latipes Japán rizshal vagy Medaka	25 ± 2		12 – 16 (4)	a kikelést követően 30 nap	17	80 %	80 %
Torkolati és tengeri							
Cyprinodon variegatus Tarka fogasponty	25 ± 1,5	15–35 (5)	12 – 16 (4)	a vizsgálat kezdetét követően 32 nap (vagy a kikelést követően 28 nap)	17	75 %	80 %
Menidia sp. Atlanti ezüstösoldalú hal	22–25	15–35 (5)	13	28 nap	20	80 %	60 %

Jelmagyarázat:

(1) A jellemző minimális átlagos teljes hossz nem érvényességi kritérium, ugyanakkor a megadott értéktől való elmaradást a vizsgálat érzékenységének tükrében körültekintően vizsgálni kell. A minimális átlagos teljes hossz az aktuálisan rendelkezésre álló adatokból származik.

(2) A szivárványos pisztrángok vizsgált törzse más hőmérsékletek alkalmazását teheti szükségessé. A tenyészállományt ugyanolyan hőmérsékleten kell tartani, mint a petéket. A tenyésztőtől történő átvételt követően rövid adaptációs időre (pl. 1–2 óra) van szükség, hogy a peték alkalmazkodjanak a vizsgálati hőmérséklethez.

(3) A lárvákat a kikelés után egy hétig sötétben kell tartani, kivéve a vizsgálatok idejét, majd a vizsgálat folyamán mindvégig félhomályt kell fenntartani (12–16 órás megvilágítás) (4).

(4) Bármilyen vizsgálati körülmény esetén a megvilágítási rend legyen állandó.

(5) Bármilyen vizsgálat esetén ez ± $2^0/_{00}$-ben térhet el.

02008R0440 — HU — 16.10.2019 — 008.001 — 2447

▼M7

3. függelék

A VIZSGÁLATHOZ JAVASOLT FAJOKBÓL SZÁRMAZÓ TENYÉSZÁLLATOK ÉS KÍSÉRLETI ÁLLATOK ETETÉSÉRE ÉS KEZELÉSÉRE VONATKOZÓ IRÁNYMUTATÁS

FAJ	TÁP (*)				A KIKELÉST KÖVETŐ ÁTHELYEZÉS IDŐPONTJA	AZ ELSŐ ETETÉSIG ELTELT IDŐ
	Tenyészhalak	Frissen kikelt lárvák	Növendék halak			
			Típus	Gyakoriság		
Édesvízi:						
Oncorhynchus mykiss Szivárványos pisztráng	pisztrángtáp	Nincs ([a])	starter pisztrángtáp BSN	napi 2–4 adag táp	14–16 nappal a kikelést követően vagy a felúszáskor (nem fontos)	19 nappal a kikelést követően vagy a felúszáskor
Pimephales promelas Amerikai cselle	BSN, pehely FBS	BSN	BSN48, pehely	napi 2–3 alkalommal	amikor a kikelés 90 %-os	2 nappal a kikelést követően
Danio rerio Zebradánió	BSN, pehely	kereskedelmi táp lárvák számára, protozoa ([b]), protein ([c])	BSN48, pehely,	BSN, naponta egyszer; pehely naponta kétszer	amikor a kikelés 90 %-os	2 nappal a kikelést követően
Oryzias latipes Japán rizshal vagy Medaka	pehely	BSN, pehely (vagy protozoa vagy kerekesférgek)	BSN48, pehely (vagy kerekesférgek)	BSN naponta egyszer; pehely naponta kétszer vagy pehely és kerekesférgek naponta egyszer	nem alkalmazandó	6–7 nappal az ívást követően
Torkolati és tengeri:						
Cyprinodon variegatus Tarka fogasponty	BSN, pehely, FBS	BSN	BSN48	napi 2–3 adag táp	nem alkalmazandó	1 nappal a kikelést követően/ felúszáskor
Menidia sp. Atlanti ezüstösoldalú hal	BSN48, pehely	BSN	BSN48	napi 2–3 adag táp	nem alkalmazandó	1 nappal a kikelést követően/ felúszáskor

Jelmagyarázat:

(*) A táplálékot a jóllakásig javasolt adni. A felesleges táplálékot és az ürüléket a hulladékok felhalmozódásának elkerülése érdekében el kell távolítani

FBS fagyasztott sórákok; kifejlett *Artemia* sp

BSN nauplius sórák; frissen kikelt

BSN48 nauplius sórák; 48 órás

([a]) a szikzacskós lárvák nem igényelnek táplálékot

([b]) vegyes tenyészetből szűrve

([c]) fermentációs folyamatból származó granulumok

▼M7

4. függelék

AZ ELFOGADHATÓ MINŐSÉGŰ HÍGÍTÓVÍZ NÉHÁNY FONTOSABB KÉMIAI TULAJDONSÁGA

Összetevő	Határkoncentráció
Finomszemcsés anyag	5 mg/l
Teljes szervesszén-tartalom	2 mg/l
Nem ionizált ammónia	1 µg/l
Maradék klór	10 µg/l
Szerves foszfort tartalmazó növényvédő szerek összesen	50 ng/l
Szerves klórtartalmú peszticidek + poliklórozott bifenilek	50 ng/l
Összes szerves klór	25 ng/l
Alumínium	1 µg/l
Arzén	1 µg/l
Króm	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Réz	1 µg/l
Vas	1 µg/l
Ólom	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Cink	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Higany	100 ng/l
Ezüst	100 ng/l

▼M7

5. függelék

STATISZTIKAI ÚTMUTATÓ AZ NOEC MEGHATÁROZÁSÁHOZ

Általános rész

Az elemzés egysége a párhuzamos tartály. Tehát folyamatos mennyiségek esetén, mint például a méret, ki kell számítani a párhuzamos minták átlagát vagy mediánját, és ezek a párhuzamos értékek lesznek az elemzendő adatok. Az alkalmazott vizsgálat statisztikai erejét lehetőleg az egyes laboratóriumok megfelelő, korábbi kontrolladatokból álló adatbázisa alapján igazolni kell. A 75–80 %-os erő mellett kimutatható mérethatást minden egyes végpontra vonatkozóan meg kell adni az alkalmazandó statisztikai próbával.

A vizsgálati módszer kidolgozásának időpontjában rendelkezésre álló adatbázisok meghatározzák a javasolt statisztikai eljárások keretében elérhető statisztikai erőt. Az egyes laboratóriumoknak igazolniuk kell, hogy teljesíteni tudják az említett statisztikai erőre vonatkozó követelményt, oly módon, hogy saját maguk elvégzik az erőre vonatkozó elemzést vagy igazolják, hogy a variációs koefficiens egyetlen válaszreakció esetében sem haladja meg a vizsgálati iránymutatás kidolgozása során használt variációs koefficiensek 90. percentilisét. A variációs koefficiens értékeit az 1. táblázat tartalmazza. Amennyiben csak a párhuzamosok átlagai vagy mediánjai állnak rendelkezésre, a párhuzamoson belüli variációs koefficienst figyelmen kívül lehet hagyni.

1. táblázat

A kiválasztott édesvízi fajok 90. percentilis értékeinek variációs koefficiense

Faj	Válaszreakció	A párhuzamosok közötti variációs koefficiens	A párhuzamosokon belüli variációs koefficiens
Szivárványos pisztráng	Hossz	17,4	9,8
	Tömeg	10,1	28
Amerikai cselle	Hossz	16,9	13,5
	Tömeg	11,7	38,7
Zebradánió	Hossz	43,7	11,7
	Tömeg	11,9	32,8

A laboratóriumi toxikológiai vizsgálatok értékelésére alkalmazott szinte valamennyi statisztikai vizsgálat célja a kezelt és a nem kezelt csoport összehasonlítása. Ezért a Dunnett- vagy a Williams-féle próbák elvégzése előtt nem helyénvaló szignifikáns ANOVA F-próbát előírni, vagy szignifikáns Kruskal–Wallis-féle próbát Jonckheere–Terpstra-, Mann–Whitney- vagy Dunn-féle próba elvégzése előtt (Hochberg és Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al*. 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

A Dunnett-féle próba magában foglalja a többszörös összehasonlítás korrekcióját, a szelekciós tesztként elvégzett F-próba kedvezőtlen hatással van a Dunnett-féle próba által kiadott hamis pozitív és hamis negatív eredmények arányára. Ehhez hasonlóan a lépésenként 0,05-ös szignifikanciaszintet alkalmazó Williams- és Jonckheere–Terpstra-féle lefelé lépegető próbák általánosan megőrzik az 5 %-os hamis pozitív arányt, és ezt az arányt, valamint a vizsgálat statisztikai erejét a szelekciós tesztként elvégzett F- vagy Kruskal–Wallis-féle próba negatívan befolyásolja. A Mann–Whitney- és a Dunn-féle próba esetében is el kell végezni a többszörös összehasonlításra tekintettel történő korrekciót, és a Bonferroni–Holm-féle korrekció javasolt.

A hipotézisvizsgálatokra vonatkozó ajánlások többségét és az említett vizsgálatok alapját képező feltételezések ellenőrzését a széles körű szakirodalmi jegyzéket is tartalmazó OECD (2006) iránymutatás részletesen tárgyalja.

▼M7

A kontrollok kezelése oldószer használata esetén

Oldószer alkalmazása esetén hígítóvizes és oldószeres kontrollt is be kell állítani. A két kontrollt minden egyes válaszreakció tekintetében össze kell hasonlítani, és amennyiben a kontrollok között nem tapasztalható szignifikáns eltérés, úgy azokat statisztikai elemzés céljából egyesíteni kell. Ellenkező esetben az oldószeres kontrollt kell használni az NOEC meghatározására vagy az EC_x érték becslésére, a vizes kontrollt pedig figyelmen kívül kell hagyni. Lásd az érvényességi kritériumokban szereplő korlátozásokat (7. pont)

A hosszúság, a tömeg, a peték kikelési vagy a lárvák mortalitási aránya, illetve a rendellenesen fejlődött lárvák aránya, továbbá a kikelés vagy a felúszás első vagy utolsó napja tekintetében t-próbát vagy Mann–Whitney-féle próbát kell végezni a hígítóvizes és az oldószeres kontroll összehasonlítására 0,05-ös szignifikanciaszint mellett, valamennyi kezelt csoport figyelmen kívül hagyásával. A vizsgálatok eredményeit jegyzőkönyvbe kell foglalni.

A méretre vonatkozó mérések (hossz és tömeg)

A halegyedek hosszára és tömegére vonatkozó értékek normális vagy log-normális eloszlásúak lehetnek. A párhuzamos vizsgálatok átlagai a centrális határeloszlás-tétel értelmében általában mindkét esetben normális eloszlást mutatnak, és ezt három édesvízi fajjal végzett több mint száz ELS (korai életszakasz)-vizsgálat adatai is alátámasztják. Amennyiben az adatok vagy a korábbi adatbázisok a halegyedek méretére vonatkozó értékek tekintetében log-normális eloszlásra utalnak, úgy ki lehet számítani a párhuzamosonként a halegyedekre vonatkozó átlagértékek logaritmusát, ahol az elemzendő adatok a párhuzamosok átlagai logaritmusainak antilogaritmusai lesznek.

Az adatokat a normális eloszlásnak való megfelelés és a varianciahomogenitás teljesülése szempontjából értékelni kell. E célból az ANOVA modell reziduálisai a koncentrációval mint egyetlen magyarázó változóval használandók. Vizuális meghatározást lehet végezni szórásdiagramok és hisztogramok segítségével, vagy szár-levél diagramokat lehet használni. E helyett végezhető formális próba is, mint például a Shapiro–Wilk- vagy az Anderson–Darling-féle próba. A varianciahomogenitás teljesülését ugyanazon szórásdiagram alapján vizuális meghatározással vagy formálisan, Levene-féle próbával lehet megállapítani. A normalitás és a variancia homogenitása tekintetében csak paraméteres próbákat (pl. Williams, Dunnett) kell értékelni.

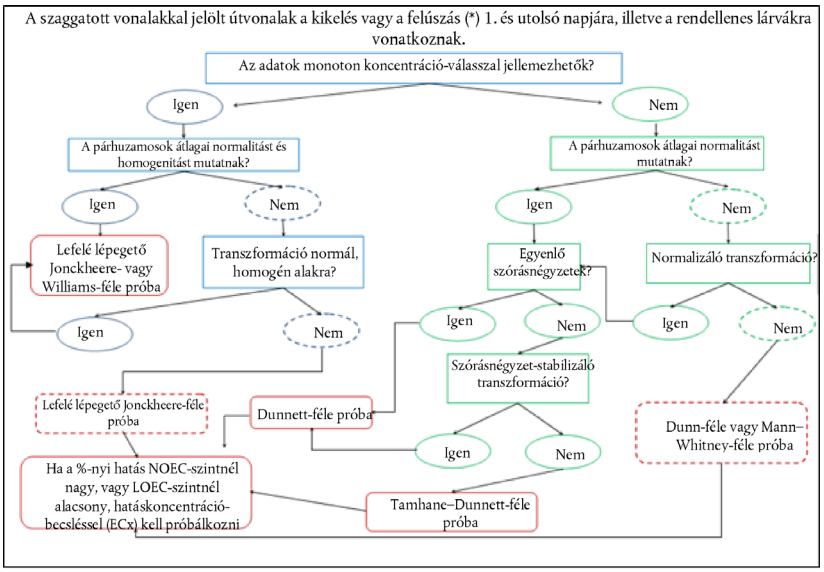
Figyelmet kell fordítani az esetleges kiugró értékekre és azok elemzésre gyakorolt hatására. A Tukey-féle kiugróérték-próbát és a fent leírt reziduálisok ábráinak vizuális ellenőrzését lehet alkalmazni. Figyelembe kell venni, hogy a megfigyelések a párhuzamos vizsgálatok egészére vonatkoznak, tehát egy kiugró értéket csak gondos mérlegelés után tanácsos az elemzés során figyelmen kívül hagyni.

Azok a statisztikai vizsgálatok, amelyek felhasználják a kísérleti elrendezés jellemzőit és a biológiai elvárásokat, lefelé lépegető trendpróbák, mint például a Williams- és Jonckheere–Terpstra-féle próbák. Ezek a vizsgálatok monoton koncentráció-hatás összefüggést feltételeznek, és az adatokat aszerint kell értékelni, hogy megfelelnek-e ennek a feltételezésnek. Ezt a párhuzamosok átlagát a vizsgálati koncentráció függvényében ábrázoló szórásdiagram vizuális értékelésével lehet megállapítani. Segíthet, ha a szórásdiagramra egy szakaszonként lineáris görbét fektetnek, ami összeköti a párhuzamos vizsgálatokon belüli mintaméretttel súlyozott átlagkoncentrációkat. A szakaszonként lineáris görbe nagymértékű eltérése a monotonitástól arra utalna, hogy a trendpróbák helyett más próbákat kellene használni. Alternatívaként formális próbák alkalmazhatók. Egy egyszerű formális próba a koncentrációk átlagértékeinek lineáris és kvadratikus kontrasztjainak kiszámítását célozza. Amennyiben a kvadratikus kontraszt szignifikáns, a lineáris kontraszt pedig nem szignifikáns, az a monotonitással kapcsolatos problémára utalhat, amit a görbék alapján további értékelésnek kell alávetni. Ahol felvetődik a normalitás és a varianciahomogenitás kérdése, az említett kontrasztokat rangsorba rendezett transzformált adatokból lehet létrehozni. Egyéb eljárások, mint például a Bartholomew-teszt is alkalmazhatók a monotonicitás vizsgálatára, viszont ezek összetettebb eljárások.

▼M7

2. ábra

NOEC folyamatábra – a méretre vonatkozó mérések (hosszúság és tömeg)



(*) Ezen válaszok esetében soha nem teljesülnek a paraméteres elemzések vagy modellek feltevései

Azokat az eseteket kivéve, ahol az adatok nem felelnek meg ezen próbák követelményeinek, a NOEC a Williams- vagy a Jonckheere–Terpstra-féle próba lefelé lépegető alkalmazásával határozható meg. Az OECD (2006) iránymutatása részletesen ismerteti ezeket az eljárásokat. A lefelé lépegető trendpróba követelményeinek nem megfelelő adatok esetén Dunnett-féle próbát vagy Tamhane–Dunnett (T3) tesztet lehet alkalmazni; mindkét teszt magában foglalja a többszörös összehasonlítások miatt szükséges korrekciót. Ezek a próbák feltételezik a normalitást, a Dunnett-féle próba pedig a variancia homogenitását. Amennyiben ezek a feltételek nem teljesülnek, Dunn-féle nem-paraméteres próbát lehet végezni. Az OECD (2006) iránymutatása tartalmazza az említett próbák részleteit. A 2. ábra áttekintést ad arról, hogy a megfelelő vizsgálatot hogyan lehet megválasztani.

A peték kikelése és a lárvák túlélése

Az adatok a kikelt peték vagy a túlélő lárvák aránya az egyedi párhuzamosokban. Ezeket az arányokat az extra-binomiális variancia szempontjából értékelni kell, ami az ilyen mérések esetében szokásos, de nem általános eljárás. A 3. ábrán látható folyamatábra útmutatást ad a választható vizsgálatokra vonatkozóan; a részletes leírást lásd a szövegben.

Két próbát alkalmaznak gyakran. A Tarone C(α) tesztet (Tarone, 1979) és a khí-négyzet próbát, amelyeket minden egyes vizsgálati koncentrációra külön-külön kell alkalmazni. Amennyiben akár egyetlen vizsgálati koncentráció esetében extra-binomiális varianciát találnak, akkor az erre alkalmas módszert kell használni.

1. képlet

Tarone C (α) teszt (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{2\sum_{j=1}^{m} n_j(n_j - 1)\right\}^{1/2}}$$

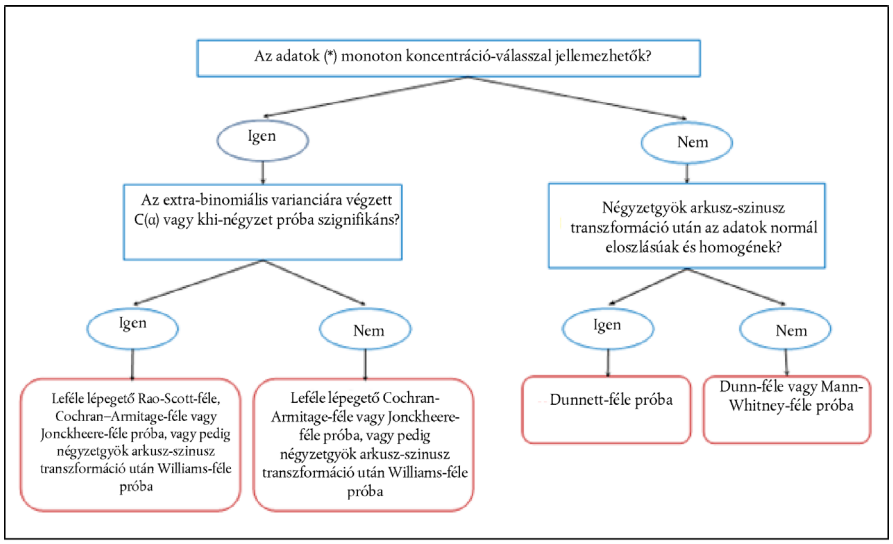
ahol $\hat{p}$ az átlagos arány egy adott koncentráció esetében, **m** a párhuzamos tartályok száma, $\mathbf{n_j}$ a párhuzamosokban lévő állatok száma **j**, és $\mathbf{x_j}$ az adott párhuzamosban lévő válaszreakciót mutató állatok száma, pl. nem kelt ki vagy elpusztult. Ezt a vizsgálatot minden egyes koncentrációra külön-külön kell elvégezni.

▼M7

Ezt a tesztet módosított khí-négyzet próbának lehet tekinteni, ugyanakkor a Tarone által végzett, korlátozott statisztikai erőre vonatkozó szimulációk azt bizonyították, hogy nagyobb statisztikai erőt képvisel, mint a khí-négyzet próba.

3. ábra

A peték kikelésére és a lárvák mortalitására vonatkozó NOEC folyamatábra



(*) Az adatok a párhuzamosok arányait mutatják

Amennyiben az extra-binomiális varianciára nincs szignifikáns bizonyíték, a lefelé lépegető Cochran–Armitage-féle próbát lehet alkalmazni. Ez a próba nem veszi figyelembe a párhuzamosokat, így amennyiben van ilyen bizonyíték, úgy a Cochran–Armitage-féle próba Rao–Scott-féle módosítását javasolt elvégezni, amely számításba veszi a párhuzamosokat, azok méretét és az extra-binomiális varianciát. Végezhető még lefelé lépegető Williams- és Jonckheere–Terpstra-féle próba, valamint Dunnett-féle próba a méretre vonatkozó mérésekre leírtak szerint. Az említett próbák extra-binomiális variancia esetén, illetve annak hiányában is alkalmazhatók, azonban némiképp alacsonyabb statisztikai erőt képviselnek (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao és Scott 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

A kikelés vagy a felúszás első vagy utolsó napja

A válaszreakció egy egész szám, amely azt a vizsgálati napot adja meg, amelyen a jelzett megfigyelést végezték az adott párhuzamos tartály esetében. Az értéktartomány általában igen szűk, és gyakran nagy a kötött értékek aránya, pl. a kikelés első napja valamennyi kontrollpárhuzamosban és esetleg egy vagy két alacsony vizsgálati koncentrációban megegyezik. Az ilyen adatok esetében a paraméteres próbák, mint például a Williams- és a Dunnett-féle próba, nem megfelelőek. Hacsak nincs bizonyíték arra, hogy az eredmények a monotonitástól jelentősen eltérnek, a lefelé lépegető Jonckheere–Terpstra-féle próba nagyon erőteljes módszer a vizsgálati vegyi anyag hatásainak kimutatására. Egyébként a Dunn-féle próbát lehet alkalmazni.

A lárvák rendellenességei

A válaszreakció a valamilyen rendellenességet mutató lárvák száma. Ennek a válaszreakciónak az előfordulási gyakorisága általában alacsony, és néhány olyan probléma merül fel vele kapcsolatban, mint a kikelés első napja esetében, valamint a koncentráció-hatás összefüggés néha szabálytalan. Amennyiben az adatok legalább hozzávetőleg monoton koncentrációs görbét követnek, a lefelé lépegető Jonckheere–Terpstra-féle próba erőteljes módszer a hatások kimutatására. Egyébként a Dunn-féle próbát lehet alkalmazni.

▼**M7**

HIVATKOZÁSOK:

Agresti, A. (2002); Categorical Data Analysis, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, J. American Statistical Association 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, Technometrics 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, Risk Analysis 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, Canadian Journal of Statistics 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); Multiple Comparison Procedures, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); Multiple Comparisons: Theory and Methods; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, Biometrika 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris..

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) – A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) – A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. (1988); Order restricted statistical inference, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, Biometrika 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratotlogy, Biometrics 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, 9-14.

▼M7

6. függelék

STATISZTIKAI ÚTMUTATÓ REGRESSZIÓS BECSLÉSEKHEZ

Általános rész

A modell illesztéséhez alkalmazott megfigyelések a párhuzamosok átlagai (hosszúság és tömeg) vagy azok arányai (a peték kikelése és a lárvák mortalitása) (OECD 2006).

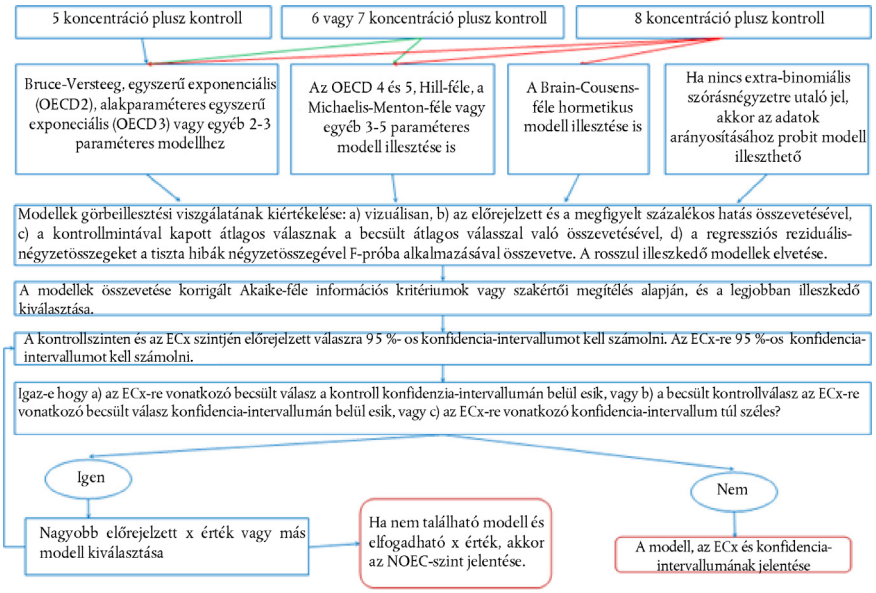
Általában a párhuzamos minták méretét súlyként használó súlyozott regresszió a javasolt módszer. Más súlyozási rendszerek is alkalmazhatók, mint például az előrejelzett átlagos válaszreakcióval történő súlyozás, valamint ennek és a párhuzamos minták méretével való súlyozásnak a kombinációja. A koncentráción belüli mintavariancia reciprokával történő súlyozás nem ajánlott (Bunke *et al.* 1999, Seber és Wild, 2003, Motulsky és Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

A válaszreakciók elemzést megelőző bármilyen transzformációja esetén meg kell őrizni a megfigyelések függetlenségét, és az ECx értékét és konfidenciahatárait az eredeti mértékegységben és nem a transzformált egységben kell kifejezni. Például a hosszúság logaritmusának 20 %-os változása nem egyenértékű a hosszúság 20 %-os változásával (Lyles *et al.* 2008, Draper és Smith 1999).

A 4. ábrán látható folyamatábra áttekintést nyújt az ECx becsléseire vonatkozóan. További részletek az alábbi szövegben találhatók.

4. ábra

A párhuzamosok átlagos hosszára és tömegére, vagy a peték kikelésére és a lárvák mortalitására vonatkozó EC_x becslések folyamatábrája, a részleteket lásd a szövegben



A peték kikelésével és a lárvák mortalitásával kapcsolatos megfontolások

A peték kikelése és a lárvák mortalitása tekintetében általában a legjobb megoldás egy csökkenő modell illesztése, kivéve, ha az alább ismertetett probit modell illesztését választják. Tehát a ki nem kelt peték vagy az elpusztult lárvák arányát kell modellezni. Ennek az az oka, hogy az ECx arra a koncentrációra utal, amely esetében a kontrollok átlagos válaszreakciójának x %-ával egyenértékű változás következik be. Amennyiben a kontrollpeték 5 %-a nem kel ki és a kikelés sikertelenségét modellezik, akkor az EC_{20} azt a koncentrációt jelenti, amely esetében a kontrollpeték 5 %-os sikertelen kikelése 20 %-kal változik, ami 0,2*0,05=0,01 értékű vagy 1 százalékpontos változásnak, azaz 6 %-os sikertelen kikelésnek felel meg. Ilyen csekély változást a rendelkezésre álló adatokból nem

▼M7

lehet megbecsülni és annak biológiai szempontból nincs jelentősége. Amennyiben a kikelő peték arányát modellezik, a kontrollarány ebben a példában 95 % lesz és a kontroll átlagának 20 %-os csökkenése 0,95*0,2=0,18 értékű változást jelentene, tehát a kikelés sikeressége 95 %-ról 77 %-ra csökken (= 95–18) és ezt a hatást okozó koncentrációt lehet megbecsülni, ami feltehetően nagyobb jelentőséggel bírhat. Ez a méretre vonatkozó mérésekkel kapcsolatosan nem jelent problémát, noha a méretre gyakorolt kedvezőtlen hatások általában méretcsökkenést jelentenek.

A méretre (hosszúság és tömeg) és a peték kikelésének sikerességére vagy a lárvák túlélésére vonatkozó modellek

A Brain–Cousens-féle hormetikus modell kivételével az OECD (2006) iránymutatás az említett modellek mindegyikét ismerteti és ajánlja. Az OECD 2–5 elnevezésű modellekben foglaltakat az ökotoxicitás-vizsgálatok kapcsán Slob (2002) tanulmánya is tárgyalja. Természetesen számos egyéb modell hasznos lehet. Bunke és munkatársai (1999) számos olyan modellt sorolnak fel, amelyek itt nem kerültek említésre, és bőségesen állnak rendelkezésre más modellekre való hivatkozások. Az alábbiakban felsorolt modellek az ökotoxicitás-vizsgálatok esetében különösen alkalmasak és széles körben elterjedtek.

5 vizsgálati koncentrációval és kontrollal

— Bruce–Versteeg

— Egyszerű exponenciális (OECD 2)

— Exponenciális alak-paraméterrel (OECD 3)

— Egyszerű exponenciális alsó határértékkel (OECD 4)

6 vagy ennél több vizsgálati koncentrációval és kontrollal

— Exponenciális alak-paraméterrel és alsó határértékkel (OECD 5)

— Michaelis–Menten

— Hill

Amennyiben hormézis látható (a peték sikeres kikelése vagy a lárvák túlélése esetén nem valószínű, ugyanakkor a méretre vonatkozó megfigyelések során néha előfordul)

— Brain–Cousens hormetikus modellje; Brain és Cousens (1989)

A peték sikertelen kikelésére és a lárvák mortalitására vonatkozó egyéb modellek

— Az ilyen válaszreakciókra alkalmazható növekvő modellekre probit (vagy logisztikus) modelleket lehet illeszteni, amennyiben az extra-binomiális varianciára nincs bizonyíték és a kontroll incidenciája becsülve van a modell illesztésekor. Nem ezt a módszert kell előnyben részesíteni, mivel ebben az egyed és nem a párhuzamos az elemzési egység (Morgan 1992, O'Hara Hines és Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Egyetlen modell illeszkedésének megfelelősége

— Minden egyes vizsgálati koncentráció esetében vizuálisan össze kell hasonlítani a megfigyelt és az előrejelzett százalékos csökkenést (Motulsky és Christopoulos 2004, Draper és Smith 1999).

— F-próba alkalmazásával össze kell hasonlítani a regresszió átlagos négyzetes hibáját a tiszta átlagos négyzetes hibával (Draper és Smith 1999).

— Ellenőrizni kell, hogy a modell minden feltétele jelentősen eltér-e a nullától (vagyis meg kell határozni, hogy a modell valamennyi feltétele fontos-e) (Motulsky és Christopoulos 2004).

▼M7

— A regresszió reziduálisainak a vizsgálati koncentráció függvényében történő ábrázolása, lehetőleg log(koncentráció) skálán. Ennek az ábrának nem kell semmilyen mintázatot követnie; a pontoknak véletlenszerűen kell szóródniuk egy vízszintes egyenes mentén a nulla magasságában.

— Az adatokat a normalitás és varianciahomogenitás szempontjából kell értékelni az 5. függelékben feltüntetett módszerrel megegyezően.

— Emellett a regressziós modell maradékainak normalitását ugyanazokat a módszereket alkalmazva kell értékelni, mint amelyeket az 5. függelék az ANOVA reziduálisai tekintetében ismertet.

A modellek összehasonlítása

— Akiake AICc-kritériumait kell alkalmazni. Az alacsonyabb AICc-értékek a jobb illeszkedést jelzik és amennyiben AICc(B)-AICc(A)≥10, akkor az A. modell szinte biztosan jobb, mint a B. modell (Motulsky és Christopoulos (2004).

— Vizuálisan össze kell hasonlítani a két modellt aszerint, hogy az egyetlen modellre vonatkozó fenti kritériumoknak mennyire felelnek meg.

— A takarékosság elvét javasolt követni, miszerint a legegyszerűbb modellt kell alkalmazni azok közül, amelyek kellően jól illeszkednek az adatokhoz (Ratkowsky 1993, Lyles et al. 2008).

Az EC_x becslés minősége

Az EC_x konfidencia-intervalluma nem lehet túl tág. Statisztikai megítélés szükséges annak eldöntésére, hogy a konfidencia-intervallum mennyire lehet tág, hogy az EC_x még használható legyen. A peték kikelésére és a méretre vonatkozó adatokhoz illeszkedő regressziós modellek szimulációi azt mutatják, hogy az EC_x (x=10, 20 vagy 30) konfidencia-intervallumainak 75 %-a nem lép túl két vizsgálati koncentrációt. Ez általános útmutatást ad arra vonatkozóan, hogy mi az elfogadható, és praktikus útmutató arra, hogy mi az, ami megvalósítható. Számos szerző állítja, hogy szükség van arra, hogy a konfidencia-intervallumokat a modellek minden paramétere tekintetében feljegyezzék, és hogy a modellparaméterek tág konfidencia-intervallumai elfogadhatatlan modelleket jeleznek (Ott és Longnecker 2008, Alvord és Rossio 1993, Motulsky és Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber és Wild 2003, Bunke *et al*. 1999, Environment Canada 2005).

Az EC_x (vagy bármely más modellparaméter) konfidencia-intervalluma nem tartalmazhatja a nullát (Motulsky és Christopoulos 2004). Ez a minimális szignifikáns különbséggel egyenértékű regresszió, amelyet a hipotézisvizsgálati megközelítésekben gyakran említenek (pl. Wang *et al*. 2000). Ez a konfidencia-intervallummal is megegyezik, hogy az LOEC szintjén mért átlagos válaszreakció ne tartalmazza a kontroll átlagát. Vizsgálni kell, hogy a paraméterek becslései tudományosan elfogadhatók-e. Pl. ha az y0 konfidencia-intervalluma ±20 %, akkor egyetlen EC_{10} becslés sem elfogadható. Amennyiben a modell 20 %-os hatást jelez előre C koncentrációnál és a maximális megfigyelhető hatás C és annál alacsonyabb koncentrációnál 10 %-os, akkor az EC_{20} nem elfogadható (Motulsky és Christopoulos 2004, Wang *et al.* 2000, Environment Canada 2005).

Az EC_x nem teheti szükségessé a pozitív koncentrációk tartományán kívüli extrapolációt (Draper és Smith 1999, OECD 2006). Az EC_x értékére vonatkozó általános iránymutatás az lehet, hogy az érték ne legyen több mint kb. 25 %-kal a legalacsonyabb vizsgálati koncentráció alatt, vagy ne legyen több mint kb. 25 %-kal a legmagasabb vizsgálati koncentráció felett.

HIVATKOZÁSOK:

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed res. 29: 93-96.

▼M7

Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); Modelling Binary Data, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); Modelling Survival Data in Medical Research, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); Applied Regression Analysis, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OECD (2006); Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, Nonlinear Regression, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.

▼M7

C.48. A HALAKON VÉGZETT RÖVID TÁVÚ REPRODUKCIÓS VIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 229. vizsgálati iránymutatásában (2012) leírt módszerrel. Az endokrin rendszerre ható vegyi anyagok halfajokban történő kimutatására alkalmas vizsgálat kifejlesztése és validálása iránti igény azokból az aggodalmakból ered, hogy a vegyi anyagok a környezetben előforduló mennyiségükben az endokrin rendszerrel való kölcsönhatásuk révén káros hatással lehetnek az emberekre és az élővilágra egyaránt. 1998-ban az OECD a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint a hormonháztartást esetlegesen zavaró anyagok kiszűrését és vizsgálatát célzó új vizsgálati iránymutatások kidolgozására irányuló, kiemelt fontosságú tevékenységet indított. E tevékenység egyik eleme a halfajok endokrin rendszerére ható vegyi anyagok kiszűrésére vonatkozó vizsgálati iránymutatás kidolgozása volt. A halakon végzett rövid távú reprodukciós vizsgálatot a kiválasztott vegyi anyagokkal végzett, laboratóriumok közötti vizsgálatokból álló alapos validálási programnak vetették alá, hogy bizonyítsák a vizsgálat relevanciáját és megbízhatóságát a halak szaporodását különböző, többek között az endokrin rendszerre ható mechanizmusokon keresztül befolyásoló vegyi anyagok kimutatása szempontjából (1, 2, 3, 4, 5). Az OECD vizsgálati iránymutatásában szereplő valamennyi végpontot validálták az amerikai cselle tekintetében, és a végpontok egy részét (vagyis a vitellogenint és a másodlagos ivari jellegeket) a japán rizshal és (a vitellogenint) a zebradánió esetében. A validációs munka szakértői értékelését egyrészről az OECD vizsgálati iránymutatási programjának nemzeti koordinátorai által kinevezett szakértői testület (6), másrészről az Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynöksége által megbízott független szakértői testület (29) végezte. A vizsgálat célja nem a hormonális zavarok specifikus mechanizmusainak meghatározása, mivel a vizsgálati állatok ép hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) tengellyel rendelkeznek, amely olyan vegyi anyagokra is reagálhat, amelyek eltérő szinteken gyakorolnak hatást a HPG-tengelyre.

2. Az e fejezetben ismertetett vizsgálati módszer egy *in vivo* szűrővizsgálati eljárást ír le, amelynek során ivarérett hím és ívási szakaszban lévő nőstény halakat tartanak együtt és tesznek ki vegyi anyag hatásának életciklusuk egy korlátozott szakaszában (21 napig). A 21 napig tartó expozíciós időszak végén két biomarker végpontot kell mérni a hímeknél és a nőstényeknél a vizsgálati vegyi anyag endokrin rendszerre kifejtett hatásának mutatójaként; ez a két végpont a vitellogenin és a másodlagos ivari jellegek. A vitellogenint az amerikai csellénél, a japán rizshalnál és a zebradániónál kell mérni, míg a másodlagos ivari jelleget az amerikai csellénél és a japán rizshalnál. Ezenkívül a vizsgálat során a fekunditás mennyiségi ellenőrzését naponta el kell végezni. Az ivarmirigyeket is konzerválni kell, és kórszövettani értékelés végezhető a kísérleti állatok szaporodási képességének ellenőrzése, valamint más végpontok bizonyító erejének növelése céljából.

3. Ez a biológiai vizsgálat *in vivo* reprodukciós szűrővizsgálati célokat szolgál, és alkalmazását az „OECD fogalmi kerete az endokrin rendszert károsító vegyi anyagok tesztelésére és értékelésére” (30) című dokumentum összefüggésében kell szemlélni. Ebben a fogalmi keretben a halakon végzett rövid távú reprodukciós vizsgálat 3. szinten javasolt mint olyan *in vivo* vizsgálat, amely a kiválasztott endokrin mechanizmus(ok)ról/útvonal(ak)ról szolgáltat adatokat.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

4. A vitellogenin (VTG) általában a nőstény ikrarakó gerincesek májában termelődik a keringő endogén ösztrogénekre adott válaszként. A szikben található fehérjék prekurzora, és a májban történő megtermelődése után a vérárammal jut el a petefészekbe, ahol a fejlődő ikrák felveszik és módosítják. A vitellogenin szinte kimutathatatlan a fiatal nőstény és hím halak vérplazmájában, mivel a szervezetükben nincs elegendő keringő ösztrogén; ugyanakkor a máj az exogén ösztrogénstimulációra adott válaszul is képes vitellogenin szintetizálására és kiválasztására.

▼M7

5. A vitellogenin mérésével kimutathatók a különböző ösztrogén hatásmechanizmusú vegyi anyagok. Az ösztrogenikus vegyi anyagok kimutathatók a hím halakban végbemenő vitellogeninindukció mérésével, amely módszerre számos hivatkozás található a szakértői értékelésnek alávetett tudományos szakirodalomban (pl. (7)). A vitellogenin indukcióját aromatizálható androgénekkel szembeni expozíció után is kimutatták (8, 9). A keringő ösztrogén szintjének csökkenése a nőstényeknél – például az endogén androgént természetes ösztrogén 17β-ösztradiollá konvertáló aromatáz gátlása miatt – a vitellogeninszint csökkenését okozza, amelyet az aromatázgátló tulajdonságokkal rendelkező vegyi anyagok kimutatására lehet használni (10, 11). Az ösztrogén/aromatázgátlást követően létrejövő vitellogenin-válasz biológiai jelentőségét megállapították és széles körben dokumentálták. Lehetséges azonban, hogy a VTG-termelést a nőstényeknél az általános toxicitás és a nem az endokrin rendszerre ható toxikus hatásmechanizmusok, pl. a hepatotoxicitás is befolyásolják.

6. Több rutin mérési módszert fejlesztettek már ki és szabványosítottak. Ilyenek a fajspecifikus enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálati módszerek (ELISA), amelyek immunkémiai eljárásokat használnak a termelt vitellogeninmennyiség meghatározására az egyes halakból gyűjtött kis vér- vagy májmintákban (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). A VTG mérése céljából az amerikai cselléből vér-, a zebradánióból vér- vagy fej/farok homogenizátumot, a japán rizshalból pedig májmintát kell venni. A japán rizshal esetében jó korreláció áll fenn a vérben és a májban mért VTG-értékek között (19). A vitellogeninanalízishez előírt mintavételi eljárásokat a 6. függelék tartalmazza. A VTG mérésére szolgáló készletek széles körben elérhetők; az ilyen készleteknek validált fajspecifikus ELISA-módszeren kell alapulniuk.

7. Egyes halfajok hím egyedeinek másodlagos ivari jellegei kívülről láthatók, számszerűsíthetők és reagálnak az endogén androgének szervezetben keringő mennyiségeire; ez a helyzet az amerikai cselle és a japán rizshal esetében, de a zebradánió esetében nem, mert ez a faj nem rendelkezik számszerűsíthető másodlagos ivari jellemzőkkel. A nőstények megőrzik az arra irányuló képességüket, hogy hím másodlagos ivari jellegeket fejlesszenek ki, ha vízben androgén hatású vegyi anyagoknak vannak kitéve. A tudományos irodalomban több olyan vizsgálat áll rendelkezésre, amely dokumentálja az ilyen típusú választ az amerikai cselle (20) és a japán rizshal (21) esetében. A másodlagos ivari jellegek csökkenését a hím egyedekben óvatosan kell értelmezni az alacsony statisztikai erő miatt, és az értelmezést szakértői megítélésre és a bizonyítékok súlyának mérlegelésére kell alapozni. A vizsgálatban a zebradánió használatának – az androgénhatású vegyi anyagokra reagáló számszerűsíthető másodlagos ivari jellemzők hiánya miatt –korlátai vannak.

8. Az amerikai csellében az exogén androgén expozíció fő mutatója a nőstény hal orrán található nászkiütések száma. A japán rizshal nőstény egyedeiben a papilláris nyúlványok száma képezi az androgén vegyi anyagoknak való exogén kitettség fő markerét. Az amerikai cselle és a japán rizshal ivari jellegének értékelése során követendő eljárásokat az 5A., illetve az 5B. függelék tartalmazza.

9. A halakon végzett 21 napos vizsgálat magában foglalja az ikratermelés mennyiségének értékelését és az ivarmirigyek opcionális kórszövettani vizsgálat céljából történő konzerválását. Néhány szabályozó hatóság előírhatja ezt a további végpontot is annak érdekében, hogy a kísérleti állatok szaporodási képességét átfogóbban lehessen értékelni, illetve olyan esetekben, amikor a vitellogenin és a másodlagos ivari jellegek a vegyi anyaggal történő expozícióra nem reagáltak. Noha néhány végpont nagy diagnosztikai értékű lehet (pl. a VTG-indukció a hímekben és a nászkiütés-képződés a nőstényekben), a vizsgálat nem minden végpontja (pl. a fekunditás és az ivarmirigyek kórszövettani vizsgálata) alkalmas a specifikus sejtszintű hatásmechanizmusok egyértelmű meghatározására. Ehelyett a végpontok együttesen teszik lehetővé az esetleges endokrin zavarokkal kapcsolatos következtetések levonását, és ezáltal adnak

▼M7

útmutatást a további vizsgálatokhoz. Noha nem endokrinspecifikus, a fekunditás – az endokrin rendszerre ható ismert vegyi anyagokra való bizonyított érzékenysége miatt (5) – egy fontos figyelembeveendő végpont, mivel ha a vizsgálati vegyi anyag a fekunditást és a többi végpontot nem befolyásolja, akkor nagyobb biztonsággal állítható, hogy a vegyület az endokrin rendszerre valószínűleg nincs hatással. Ugyanakkor, ha a fekunditást befolyásolja, az nagy súllyal esik latba a bizonyítékok mérlegelésekor. Az adatok értelmezésére és a vizsgálati eredmények elfogadhatóságára vonatkozó útmutatás ezen vizsgálati módszerek leírásában található.

10. Az e vizsgálati módszerben használt fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

A VIZSGÁLAT ELVE

11. A vizsgálat során a vizsgálati edényekben vegyesen elhelyezett, párzóképes állapotú hím és nőstény halakat kell kitenni valamely vegyi anyagnak. A felnőtt korú és párzóképes állapotú halakon a nemek egyértelműen megkülönböztethetők és ezáltal az egyes végpontok ivaronként elemezhetők, illetve biztosított a halak érzékenysége az exogén vegyi anyagok iránt. A vizsgálat befejezésekor a halak ivarát az ivarmirigyek makroszkopikus vizsgálatával kell alátámasztani a has ollóval történő ventrális felnyitása után. A biológiai vizsgálat lényeges feltételeiről a 2. függelék nyújt áttekintést. A vizsgálat általában ívási állapotban lévő populációból vett halakkal indul; öregedő állatokat nem szabad használni. A halak életkorára és párzóképességére vonatkozó útmutató „A halak kiválasztása” című szakaszban található. A vizsgálatot a vegyi anyag három expozíciós koncentrációjával, valamint egy vizes kontrollal és szükség esetén egy oldószeres kontrollal kell végezni. A zebradánió esetében kezelésenként két edényt vagy párhuzamost (minden edény 5 hímet és 5 nőstényt tartalmaz) kell alkalmazni. Az amerikai cselle esetében kezelésenként négy edényt vagy párhuzamost kell használni (minden edény 2 hímet és 4 nőstényt tartalmaz). Ez azért szükséges, hogy érvényesülhessen a hím amerikai csellék territoriális viselkedése, úgy, hogy a vizsgálathoz szükséges statisztikai erő is biztosított legyen. A japán rizshal esetében kezelésenként négy edényt vagy párhuzamost kell használni (minden edény 3 hímet és 3 nőstényt tartalmaz). Az expozíciót 21 napig kell folytatni, és a halakból az expozíció 21. napján kell mintát venni. A fekunditás mennyiségi ellenőrzését naponta kell végezni.

12. A 21. napon végzett mintavétel keretében az állatokat kíméletesen le kell ölni. Az amerikai cselle és a japán rizshal esetében a másodlagos ivari jelleget mérni kell (lásd az 5A. és 5B. függeléket); a zebradánióból és az amerikai csellébőlvérmintát kell gyűjteni a vitellogenin meghatározására, míg a zebradánió esetében a vitellogenin meghatározására alternatívaként fej/farok mintát is lehet gyűjteni (6. függelék); a japán rizshalból májmintát kell gyűjteni VTG-analízis céljára (6. függelék); az ivarmirigyeket egészben vagy preparálva kell fixálni az esetleges kórszövettani értékelés céljából (22).

A VIZSGÁLAT ELFOGADHATÓSÁGI KRITÉRIUMAI

13. A következő feltételeknek kell teljesülniük ahhoz, hogy a vizsgálat elfogadható legyen:

— a mortalitási arány a vizes (vagy oldószeres) kontrollokban az expozíciós idő végén nem haladhatja meg a 10 %-ot,

— az expozíciós idő alatt az oldott oxigén koncentrációjának mindvégig legalább a levegőtelítettségi érték (ASV) 60 %-ának kell lennie,

— a víz hőmérsékletében soha nem lehet ±1,5 °C-nál nagyobb eltérés az egyes vizsgálati edények között, és a hőmérséklet a vizsgálati fajra nézve meghatározott hőmérsékleti tartományon belül 2 °C-ot ingadozhat (2. függelék),

— bizonyítékkal kell alátámasztani, hogy a vizsgálati vegyi anyag oldatban lévő koncentrációit az átlagos mért értékek ±20 %-os tartományán belül sikerült tartani;

▼M7

— bizonyítékkal kell alátámasztani, hogy a halak a vegyi anyaggal történő expozíciót megelőzően minden párhuzamos tartályban és a vizsgálat során a kontrollokban aktívan ívnak.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Felszerelés

14. Normál laboratóriumi felszerelés és különösen az alábbiak:

(a) oxigéntartalom- és pH-mérők;

(b) a víz keménységi fokának és lúgosságának mérésére szolgáló berendezések;

(c) a hőmérséklet szabályozására és lehetőleg folyamatos figyelemmel kísérésére is alkalmas készülékek;

(d) kémiailag semleges anyagból készült és az ajánlott betelepítési aránynak és állománysűrűségnek megfelelő kapacitású tartályok (lásd a 2. függeléket);

(e) ívási aljzat az amerikai cselle és a zebradánió részére, a szükséges adatok a 4. függelékben találhatók;

(f) megfelelő (azaz ±0,5 mg) pontosságú mérleg.

Víz

15. A vizsgálat céljára bármilyen víz felhasználható, amelyben a vizsgálati fajok kellően hosszú ideig megélnek a vizsgálati körülmények mellett, és növekednek. A víz minőségét a vizsgálat során mindvégig azonos szinten kell tartani. A víz pH-értékének a 6,5–8,5 tartományon belül kell lennie, azonban egy adott vizsgálat során a pH-érték csak ± 0,5 egységgel térhet el a kiindulási értéktől. Annak biztosítása céljából, hogy a hígítóvíz ne gyakoroljon nem kívánt hatást a vizsgálat eredményeire (pl. mert komplexet képez a vizsgálati vegyi anyaggal), bizonyos időközönként vízmintákat kell venni és elemezni. Mérni kell a következőket: a nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd és Ni), a fontosabb anionok és kationok (pl. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, és SO_4^{2-}), a peszticidek (pl. összes szerves foszfor és összes szerves klór tartalmú peszticidek), a teljes szervesszén-tartalom és a szuszpendált szilárd anyagok, például háromhavonta, amennyiben a hígítóvíz ismerten viszonylag állandó minőségű. Amennyiben legalább egy éven keresztül állandónak bizonyul a vízminőség, a vizsgálatot ritkábban és nagyobb időközönként is el lehet végezni (pl. minden hat hónapban). Az elfogadható minőségű hígítóvíz néhány kémiai tulajdonságának felsorolása a 3. függelékben található.

Vizsgálati oldatok

16. A kiválasztott koncentrációjú vizsgálati oldatok a törzsoldat hígításával készíthetők el. A törzsoldatot lehetőleg a vizsgálati vegyi anyagnak a hígítóvízbe mechanikai eszközök (pl. keverő és/vagy ultrahang) segítségével történő bekeverésével vagy megmozgatásával kell elkészíteni. Telítési oszlopok (oldhatósági oszlopok) is használhatók a megfelelő koncentrációjú törzsoldat elkészítéséhez. Oldószer-hordozóanyag használata nem ajánlott. Ugyanakkor, ha oldószerre van szükség, párhuzamosan egy oldószeres kontrollt is futtatni kell a vegyi anyaggal történő kezelésekben alkalmazottal megegyező oldószer-koncentrációval. A nehezen vizsgálható vegyi anyagok esetében az oldószer lehet technikailag a legjobb megoldás; e tekintetben „A nehezen vizsgálható anyagok és keverékek vízi toxikológiai vizsgálata” című OECD-iránymutatást (23) kell tanulmányozni. A megfelelő oldószert az anyag vagy a keverék tulajdonságai határozzák meg. Az OECD-iránymutatás maximum 100 µl/l értéket javasol, amelyet be kell tartani. Egy közelmúltban végzett felülvizsgálat (24) azonban további aggályokra hívta fel a figyelmet az oldószerek endokrin rendszerre kifejtett hatások vizsgálatában való használatával kapcsolatban. Ezért ajánlott, hogy amennyiben feltétlenül szükség van rá, az oldószer koncentrációja a lehető legkisebb legyen, ha ez technikailag megvalósítható (a vizsgálati vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól függően).

▼M7

17. Átfolyásos vizsgálati rendszert kell használni. Ez a rendszer a koncentrációsorozatnak a vizsgálati kamrákba történő bejuttatása céljából folyamatosan adagolja és hígítja a vizsgálati vegyi anyag törzsoldatát (pl. adagolószivattyú, proporcionális hígító vagy telítőrendszer segítségével). A vizsgálat során időnként – lehetőleg naponta – ellenőrizni kell a törzsoldatok és a hígítóvíz áramlási sebességét, amelynek értéke a vizsgálat során nem változhat 10 %-nál nagyobb mértékben. Ügyelni kell arra, hogy ne használjanak rossz minőségű műanyag csöveket vagy egyéb olyan anyagokat, amelyek biológiailag aktív vegyi anyagokat tartalmazhatnak. Az átfolyásos rendszerhez használt anyagok kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgálati vegyi anyagnak a kiválasztott anyaghoz való lehetséges adszorpcióját is.

A halak tartása

18. A vizsgálati halakat laboratóriumi populációból kell kiválasztani, lehetőleg egyetlen tenyészetből, és a halakat a vizsgálat megkezdése előtt legalább két hétig a vizsgálat során alkalmazandó körülmények, vízminőség és megvilágítás mellett kell akklimatizálni. Fontos, hogy a betelepítési arány és az állománysűrűség (a fogalmak meghatározását lásd az 1. függelékben) a felhasznált vizsgálati fajnak megfelelő legyen (lásd a 2. függeléket).

19. A 48 órás betelepítési időszak után a mortalitást dokumentálni kell, és az alábbi követelményeket kell alkalmazni:

— amennyiben a mortalitás a populáció 10 %-ánál nagyobb hét nap alatt: az egész halállományt ki kell cserélni,

— amennyiben a mortalitás a populáció 5–10 %-a: további hét napig kell akklimatizálni, amennyiben a mortalitási arány ezt követően is magasabb 5 %-nál, az egész állományt ki kell cserélni;

— a mortalitás a populáció 5 %-ánál kisebb hét nap alatt: az állomány alkalmazható a vizsgálathoz.

20. Az akklimatizációs időszak során, az expozíciót előkészítő időszakban és az expozíciós idő alatt a halak nem kaphatnak semmilyen betegség elleni kezelést.

Az expozíciót előkészítő időszak és a halak kiválasztása

21. Egy-két hetes expozíciót előkészítő időszak javasolt, amelynek során az állatokat a tényleges vizsgálatban alkalmazotthoz hasonló edényekben kell elhelyezni. A halakat a tartási időszak és az expozíciós fázis alatt *ad libitum* kell etetni. Az expozíciós fázist olyan, az ivarérett kifejlett állatok laboratóriumi készletéből származó, ivari kétalakúságot mutató (pl. az amerikai cselle és a japán rizshal esetében jól látható másodlagos ivari jellegekkel rendelkező) halakkal kell megkezdeni, amelyek aktívan ívnak. Általános iránymutatásként (és ezt a szempontot nem szabad az adott halállomány tényleges reprodukciós képességétől elszigetelten szemlélni) az amerikai csellék kb. 20 (± 2) hetesek legyenek, feltételezve, hogy egész életük során 25 ± 2 °C-on tartották őket. A japán rizshalak körülbelül 16 (± 2) hetesek legyenek, feltételezve, hogy egész életük során 25 ± 2 °C-on tartották őket. A zebradániók körülbelül 16 (± 2) hetesek legyenek, feltételezve, hogy egész életük során 26 ± 2°C-on tartották őket. Az expozíciót előkészítő szakaszban az ikratermelést naponta meg kell becsülni. Az ívást ajánlatos a vizsgálat expozíciós szakaszába való bevonásukat megelőzően minden párhuzamos tartályban megfigyelni. A kívánatos napi ikratermelést illetően erre a szakaszra vonatkozóan nem lehet mennyiségi iránymutatást adni, ugyanakkor minden egyes faj esetében viszonylag általános, hogy >10 pete/nőstény/nap átlagos ikramennyiség figyelhető meg. A párhuzamosok különböző vizsgálati szintekhez való kiosztásához az ikratermelés mennyisége szerinti véletlen blokk elrendezés alkalmazandó a párhuzamosok kiegyensúlyozott eloszlásának biztosítása érdekében.

▼M7

VIZSGÁLATI ELRENDEZÉS

22. A vizsgálati vegyi anyag három koncentrációját, egy (vizes) kontrollt, illetve – szükség esetén – egy oldószeres kontrollt kell beállítani. Az adatok a kezelések és a kontrollok esetében kapott válaszok közötti statisztikailag szignifikáns különbség meghatározása érdekében elemezhetők. Ezek az elemzések nem a kockázatelemzésben hasznosak (25), sokkal inkább arról adnak tájékoztatást, hogy szükség van-e a vegyi anyag káros hatásainak további hosszabb távú vizsgálatára (vagyis a túlélés, a fejlődés, a növekedés és a szaporodás vizsgálatára).

23. A zebradánió esetében a kísérlet 21. napján hím és nőstény állatokat kell mintavételezni minden kezelési szintből (5 hím és 5 nőstény mindkét párhuzamosban), valamint a kontrollcsoport(ok)ból is a vitellogenin mérésére. A japán rizshal esetében a kísérlet 21. napján hím és nőstény állatokat kell mintavételezni minden kezelési szintből (3 hím és 3 nőstény mind a négy párhuzamosban), valamint a kontrollcsoport(ok)ból is a vitellogenin és a másodlagos ivari jellegek mérésére. Az amerikai cselle esetében az expozíció 21. napján hím és nőstény állatokat kell mintavételezni (2 hím és 4 nőstény mind a négy párhuzamosban), valamint a kontrollcsoport(ok)ból is a vitellogenin és másodlagos ivari jellegek mérésére. El kell végezni a fekunditás mennyiségi értékelését és a gonadális szöveteket egészben kell fixálni, vagy ki kell metszeni az esetleges kórszövettani értékelés céljából, amennyiben az szükséges.

A vizsgálati koncentrációk megválasztása

24. E vizsgálat esetében a legnagyobb vizsgálati koncentrációt a legnagyobb elviselhető koncentráció (maximum tolerated concentration, MTC) alapján kell meghatározni, amelyet dózisbehatároló vizsgálattal vagy egyéb toxicitási adatokból, illetve 10 mg/l-ben, vagy a maximális vízoldékonyság mértékében kell megállapítani (amelyik a legalacsonyabb). Az MTC a vegyi anyag azon legnagyobb vizsgálati koncentrációja, amely kevesebb, mint 10 %-os mortalitást eredményez. E megközelítés azt feltételezi, hogy rendelkezésre állnak azok az empirikus akut toxicitási vagy egyéb toxicitási adatok, amelyekből az MTC-t meg lehet becsülni. Az MTC becslése pontatlan lehet és alkalmazhatóságáról jellemzően egyéni szakmai megítélés alapján kell dönteni.

25. Három vizsgálati koncentrációra van szükség, amelyek közötti konstans szorzótényező nem haladja meg a 10-et, valamint egy hígítóvizes kontrollra (és szükség esetén egy oldószeres kontrollra is). 3,2 és 10 közötti szorzótényező ajánlott.

ELJÁRÁS

A vizsgálati halak kiválasztása és lemérése

26. Fontos a halak testtömegeltéréseinek minimumra csökkentése a vizsgálat elején. A vizsgálathoz javasolt különböző halfajok megfelelő mérettartományait a 2. függelék tartalmazza. A vizsgálatban alkalmazott egész halállomány tekintetében a hím és nőstény halak vizsgálat elején mért egyéni testtömegének lehetőleg az azonos nemű halak testtömege számtani átlagának ± 20 %-os tartományában kell lennie. Az átlagos testtömeg előzetes becslése céljából javasolt a vizsgálat előtt a halállomány egy részmintájának a tömegét lemérni.

Az expozíció körülményei

Időtartam

27. A vizsgálat időtartama 21 nap, egy expozíciót előkészítő időszakot követően. Az expozíciót előkészítő időszak ajánlott ideje egy–két hét.

Etetés

28. A halakat *ad libitum* kell etetni a megfelelő táplálékkal (2. függelék) olyan mennyiségben, amely segít fenntartani fizikai állapotukat. Gondosan kerülni kell a mikrobatenyészetek kialakulását és a víz zavarossá válását. Általános iránymutatásként a napi adagot két vagy három egyenlő részre lehet osztani,

▼M7

és a halakat naponta többször etetni, az egyes etetések között legalább három órát hagyva. Az egyszerre adott nagyobb adag is elfogadható, különösen hétvégén. A halak a mintavételezés/boncolás előtti 12 órában nem kaphatnak táplálékot.

29. A haltápban vizsgálni kell a szennyező anyagok – szerves klórt tartalmazó növényvédő szerek, policiklikus aromás szénhidrogének (PAH) és poliklórozott bifenilek (PCB-k) – jelenlétét. Kerülni kell a magas fitoösztrogéntartalmú táplálékokat, amelyek a vizsgálatban befolyásolnák az ismert ösztrogénagonistákra (pl. a 17b-ösztradiolra) adott választ.

30. Az el nem fogyasztott táplálékot és az ürüléket legalább hetente kétszer el kell távolítani az edényekből, pl. a tartályok alját szifonnal megtisztítva.

Fény és hőmérséklet

31. A megvilágítási időszakokat és a víz hőmérsékletét a vizsgálati fajok sajátosságaihoz kell igazítani (lásd a 2. függeléket).

Az analitikai meghatározások és mérések gyakorisága

32. Az expozíciós időszak megkezdése előtt gondoskodni kell a vegyi anyagot adagoló rendszer megfelelő működéséről. Az összes szükséges analitikai módszernek megalapozottnak kell lennie, ideértve a vegyi anyag tesztrendszerben való stabilitásával kapcsolatos ismereteket. A vizsgálat alatt a vizsgálati vegyi anyag koncentrációit rendszeres időközönként meg kell határozni az alábbiak szerint: a hígító és a toxikus törzsoldat áramlási sebességét lehetőleg naponta kell ellenőrizni, de minimum hetente kétszer, és értéke a vizsgálat során nem változhat 10 %-nál nagyobb mértékben. A vizsgálati vegyi anyag tényleges koncentrációit ajánlott minden edényben a vizsgálat elején és azt követően hetente egyszer megmérni.

33. Az eredményeket célszerű a ténylegesen mért koncentrációértékekre alapozni. Amennyiben azonban az oldatban lévő vizsgálati vegyi anyag koncentrációját sikerült a vizsgálatok során mindvégig a névleges koncentráció ± 20 %-os tartományán belül tartani, akkor az eredményeket a névleges vagy a mért értékekre is lehet alapozni.

34. Szükség lehet a minták szűrésére (0,45 μm pórusméretű szűrőbetét használatával) vagy centrifugálására. Ha erre van szükség, akkor a centrifugálás az ajánlott eljárás. Amennyiben azonban a vizsgálati anyag nem adszorbeálódik a szűrő felszínén, akkor a szűrés is elfogadható módszer.

35. A vizsgálat alatt minden vizsgálati edényben legalább hetente egyszer meg kell mérni az oldott oxigén koncentrációját, a hőmérsékletet és a pH-t. Az víz teljes keménységét és a lúgosságát legalább hetente egyszer meg kell mérni a kontrollokban és a legmagasabb vizsgálati koncentrációt tartalmazó egyik edényben. A hőmérsékletet legalább egy vizsgálati edényben folyamatosan figyelemmel kell kísérni.

Megfigyelések

36. Több általános (pl. túlélési arány) és biológiai választ (pl. VTG-szintek) kell értékelni a vizsgálat során vagy a vizsgálat befejezésekor. A fekunditás mennyiségi ellenőrzését naponta el kell végezni. E végpontok mérését és értékelését, illetve hasznosságát az alábbiak ismertetik.

Túlélés

37. A halakat a vizsgálati időszak alatt naponta meg kell vizsgálni, a mortalitást fel kell jegyezni, és az elpusztult halakat a lehető leghamarabb el kell távolítani. Az elpusztult halakat nem szabad sem a kontroll-, sem a kezelési edényekben újakra cserélni. A vizsgálat során elpusztult halak ivarát meg kell határozni az ivarmirigyek makroszkopikus vizsgálatával.

▼M7

Viselkedés és külső megjelenés

38. Minden, (a kontrollhoz képest) rendellenes viselkedést fel kell jegyezni; ide sorolhatók az általános toxicitás jelei, beleértve a hiperventillációt, a koordinálatlan úszást, az egyensúly elvesztését és az atipikus nyugalmat vagy táplálkozást. Emellett a külső rendellenességeket (vérzés, elszíneződés) is fel kell jegyezni. A toxicitás ilyen jeleit az adatok értelmezése során gondosan mérlegelni kell, mert olyan koncentrációkat jelezhetnek, amelyek mellett a hormonhatás biomarkerei nem megbízhatóak. A viselkedésre vonatkozó ilyen jellegű megfigyelések hasznos kvalitatív információkkal szolgálhatnak azzal kapcsolatban, hogy milyen jövőbeli halvizsgálatokra lehet szükség. Az amerikai cselle esetében például androgénexpozíció hatására területi agresszivitást figyeltek meg a hímekben vagy a maszkulinizált nőstényekben; a zebradániónál az ösztrogén- és antiandrogén-expozíció csökkenti vagy akadályozza a fajnál jellegzetesen az első hajnali fénnyel jelentkező párzási és ívási magatartást.

39. Mivel a külső megjelenés néhány aspektusa (elsősorban a szín) az állatok kezelésének hatására gyorsan változhat, fontos, hogy a kvalitatív megfigyeléseket az állatoknak a vizsgálati rendszerből való eltávolítása előtt végezzék el. Az amerikai csellével szerzett eddigi tapasztalatok arra utalnak, hogy egyes endokrin rendszerre ható vegyi anyagok először a következő külső jellemzőkben idéznek elő változásokat: testszín (világos vagy sötét), mintázat (függőleges sávok jelenléte), valamint a test alakja (a fej és a pektorális régió). Ezért a halak fizikai megjelenésével kapcsolatos megfigyeléseket kell tenni a vizsgálat során és a vizsgálat végén.

Fekunditás

40. Az ívás naponta végzett mennyiségi megfigyelését párhuzamosonként fel kell jegyezni. Az ikratermelést párhuzamosonként az egy túlélő nőstényre jutó napi ikrák számával kell kifejezni. Az ikrákat naponta el kell távolítani a vizsgálati kamrákból. Az amerikai cselle és a zebradánió esetében az ívási aljzatot kell a vizsgálati kamrába helyezni, hogy lehetővé váljon a halak számára a szokásos körülmények közötti ívás. A 4. függelék további részleteket tartalmaz a zebradánió (4A. függelék) és az amerikai cselle (4B. függelék) részére javasolt ívási aljzatokkal kapcsolatban. A japán rizshal esetében nem szükséges ívási aljzatot biztosítani.

A halak humánus leölése

41. A 21. napon – azaz az expozíció befejezésekor – a halakon a nyálkahártya-irritáció csökkentése érdekében 300 mg/l $NaHCO_3$ (nátrium-hidrogén-karbonát, CAS.144-55-8) oldattal pufferolt megfelelő mennyiségű trikainnal (trikain-metán-szulfonát, Metacain, MS-222 (CAS.886-86-2), 100–500 mg/l) eutanáziát kell végezni; ezután a „Vitellogenin” című szakaszban leírtak szerint vér- vagy szövetmintát kell venni a VTG-szint meghatározásához.

A másodlagos ivari jellegek megfigyelése

42. Egyes endokrin rendszerre ható vegyi anyagok változásokat idézhetnek elő a speciális másodlagos ivari jellegekben (a nászkiütések száma a hím amerikai csellében, a papilláris nyúlványok száma a hím japán rizshalban). Bizonyos hatásmechanizmusú vegyi anyagok az ellenkező ivarú állatokra jellemző másodlagos ivari jelleg kóros előfordulását idézhetik elő; a trenbolonhoz, a metiltesztoszteronhoz és a dihidrotesztoszteronhoz hasonló androgénreceptor-agonisták például a nőstény amerikai csellénél jól fejlett nászkiütések, nőstény japán rizshalaknál pedig papilláris nyúlványok megjelenését okozhatják (11, 20, 21). Azt is feljegyezték, hogy felnőtt hím amerikai csellében az ösztrogénreceptor-agonisták csökkenthetik a nászkiütések számát és a dorzális tarkólemez méretét (26, 27). Az ilyen általános morfológiára vonatkozó megfigyelések hasznos kvalitatív és kvantitatív információt nyújthatnak

▼M7

a jövőben elvégzendő, potenciálisan szükséges halvizsgálatokkal kapcsolatban. Az amerikai csellénél a nászkiütések, illetve a japán rizshalnál a papilláris nyúlványok számát és méretét közvetlenül, vagy egyszerűbben, konzervált példányokon lehet számszerűsíteni. Az amerikai cselle és a japán rizshal másodlagos ivari jellemzőinek értékelésére ajánlott eljárások az 5A., illetve az 5B. függelékben találhatók.

Vitellogenin (VTG)

43. A vérmintákat a farokartériából/vénából heparinnal kezelt mikrohematokrit kapilláriscsővel, vagy pedig fecskendővel végzett szívpunkcióval kell gyűjteni. A hal méretétől függően a begyűjthető vértérfogat példányonként általában 5–60 µl az amerikai cselle és 5–15 µl a zebradánió esetében. A plazmát a vérből centrifugálással kell elkülöníteni, és a vitellogeninszint vizsgálatáig proteázinhibitorokat hozzáadva – 80 °C-on tárolni. Alternatív megoldásként a japán rizshal esetében a májból, zebradánió esetében pedig a fej/farok homogenizátumból vett szövetminta is használható a VTG-szint meghatározásához (6. függelék). A VTG mérésének homológ VTG standardokat és homológ antitesteket használó validált homológ ELISA módszeren kell alapulnia. Olyan módszer alkalmazása javasolt, amely a VTG-t alacsony, akár néhány ng/ml vérplazma (vagy ng/mg szövet) koncentrációban is képes kimutatni, ami a vizsgálati vegyi anyagnak nem kitett hím halakban megfigyelhető háttérszintnek felel meg.

44. A VTG-analízis minőségellenőrzését standardok és vakpróbák alkalmazásával, illetve legalább két ismétlésben végzett analízis révén kell biztosítani. A minimális mintahígítási tényező meghatározása céljából minden ELISA módszer esetében le kell futtatni egy tesztet a mátrixhatás (a mintahígítás hatásának) vizsgálatára. A VTG vizsgálati eljárásokban felhasznált minden ELISA-lemeznek a következő minőségellenőrzési mintákat kell tartalmaznia: a várható VTG-koncentrációkat lefedő legalább 6 kalibrációs standard, és legalább egy nem specifikus kötődési vakpróba (két példányban analizálva). E vakpróbák abszorbanciája a kalibrációs standard maximális abszorbanciájának 5 %-ánál kisebbnek kell lennie. Az egyes hígítási minták legalább két alikvotjának (párhuzamos lyukak) analízisét el kell végezni. Azokat a párhuzamos lyukakban vizsgált mintákat, amelyek értékei között az eltérés nagyobb, mint 20 %, újra kell analizálni.

45. A kalibrációs görbék korrelációs együtthatója (R^2) 0,99-nál nagyobb kell legyen. Ugyanakkor azonban a magas korreláció nem garantálja a koncentráció megfelelő előrejelzését minden tartományban. A kalibrációs görbe elegendően nagy korrelációja mellett az egyes standardok kalibrációs görbe alapján számolt koncentrációjának a névleges koncentráció 70–120 %-a közé kell esnie. Ha a névleges koncentráció távolodik a kalibrációs regressziós egyenestől (pl. az alacsonyabb koncentrációknál), szükség lehet arra, hogy a kalibrációs görbét alacsony és magas tartományra osszák, vagy hogy egy nemlineáris modellt alkalmazzanak az abszorbanciaadatok megfelelő illesztésére. Ha a görbét kettéosztják, mindkét vonalszakasznak $R^2 > 0,99$ értékkel kell rendelkeznie.

46. A kimutatási határérték (LOD) a legalacsonyabb analitikai standard koncentrációja, a meghatározási határ (LOQ) pedig a legalacsonyabb analitikai standard koncentrációjának és a legkisebb hígítási tényezőnek a szorzata.

47. Minden olyan napon, amikor VTG-vizsgálatot végeznek, egy inter-assay (vizsgálatközi) referenciastandard felhasználásával készült dúsított mintát is analizálni kell (7. függelék). Az adott napon végzett vizsgálatok eredményeivel együtt dokumentálni kell a várt koncentrációnak a mért koncentrációhoz viszonyított arányát is.

A gonadális kórszövettani vizsgálat értékelése

48. A szabályozó hatóságok előírhatják a gonadális kórszövettani vizsgálat elvégzését annak érdekében, hogy vizsgálni lehessen a HPG-tengelyen lévő célszervet a vegyi anyaggal történő expozíciót követően. E tekintetben az ivarmirigyeket az egész testben vagy preparálva kell fixálni. Amennyiben

▼M7

kórszövettani vizsgálat szükséges, a vizsgálati vegyi anyag endokrin aktivitásának értékelése érdekében a hormonrendszer ivarmirigyekre gyakorolt specifikus válaszreakcióit kell keresni. Ezek a diagnosztikus válaszreakciók alapvetően a következők lehetnek: petesejtek jelenléte a herékben, Leydig-sejt hiperplázia, csökkent szikképződés, megnövekedett spermatogonium szám és perifollikuláris hiperplázia. Más gonadális elváltozásoknak, mint például a petevezeték átjárhatatlanságának, a herék elváltozásainak és a stádiumbeli változásoknak különböző okai lehetnek. A halak gonadális kórszövettani vizsgálatáról szóló iránymutatás előírja az ivarmirigyek boncolása, fixálása, a metszetkészítés és a kórszövettani értékelés tekintetében alkalmazandó eljárásokat (22).

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

A biomarker-válaszok értékelése varianciaanalízissel (ANOVA)

49. Egy vegyi anyag potenciális hatásának azonosítása céljából varianciaanalízissel (ANOVA) össze kell hasonlítani a kezelésenként és kontrollcsoportonként kapott válaszokat. Ha oldószeres kontrollt is alkalmaznak, minden végpont tekintetében megfelelő statisztikai próbát kell végezni a hígítóvizes és az oldószeres kontrollok összehasonlítására is. A hígítóvizes és az oldószeres kontrollok esetében kapott adatoknak a rákövetkező statisztikai elemzés során való felhasználására vonatkozó iránymutatás az OECD 2006c (28) szakirodalmi hivatkozásban található. Az összes biológiai válaszadatot elemezni és ivaronként jegyzőkönyvezni kell. Amennyiben nem teljesülnek a paraméteres módszerekhez szükséges feltételek – nem normális eloszlás (pl. Shapiro–Wilk-próba) vagy heterogénvariancia (Bartlett- vagy Levene-féle próba) –, akkor fontolóra lehet venni az adatok transzformálását a variancia homogenizálása érdekében az ANOVA elemzés elvégzése előtt, vagy a súlyozott ANOVA elemzés alkalmazását. Nem monoton dózis-válasz esetén a többszörös páronkénti összehasonlítással végzett Dunnett-féle próba (parametrikus) vagy a Bonferroni-korrekcióval végzett Mann–Whitney-féle próba (nem paraméteres) is használható. Ha a dózis-hatás nagyjából monoton, egyéb statisztikai próbákat lehet alkalmazni (pl. Jonckheere–Terpstra próba vagy Williams-féle próba). A 8. függelékben található statisztikai folyamatábra segít a legmegfelelőbb statisztikai próba kiválasztásában. További információ található az „Aktuális megközelítések az ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében” című OECD-dokumentumban (28).

A vizsgálati eredmények jegyzőkönyvezése

50. A vizsgálati adatoknak tartalmazniuk kell a következőket

Vizsgáló intézmény:

— a felelős személyzet és a vizsgálattal kapcsolatos felelősségi körök;

— minden laboratóriumnak igazolnia kell a jártasságát reprezentatív vegyi anyagok használatával.

Vizsgálati vegyi anyag:

— a vizsgálati vegyi anyag jellemzése;

— fizikai jelleg és lényeges fizikai-kémiai tulajdonságok;

— a vizsgálati koncentrációk elkészítésének módja és gyakorisága;

— a stabilitásra és a biológiai lebonthatóságra vonatkozó információk.

Oldószer:

— az oldószer jellemzése (jelleg, alkalmazott koncentráció);

— az oldószer kiválasztásának indoklása (ha nem víz).

▼M7

Kísérleti állatok:

— faj és törzs;

— beszállító és konkrét beszállító létesítmény;

— a halak életkora a vizsgálat elején, valamint a halak párzóképes/ívási állapota;

— az állatok akklimatizációjának részletei;

— a halak testtömege az expozíció elején (a halállomány részmintájában).

Vizsgálati körülmények:

— alkalmazott vizsgálati eljárás (vizsgálat típusa, betelepítési arány, állománysűrűség stb.);

— a törzsoldatok elkészítésének módszere és az áramlási sebesség;

— névleges vizsgálati koncentrációk, a vizsgálati oldatok hetente mért koncentrációi és az analitikai módszer, a vizsgálati edényekben mért értékek átlaga és szórása, valamint bizonyíték arra, hogy a mérések a vizsgálati vegyi anyag valódi oldatban lévő koncentrációira vonatkoznak;

— a hígítóvíz jellemzői (beleértve a pH-t, a keménységet, a lúgosságot, a hőmérsékletet, az oldott oxigén koncentrációját, a maradékklór-tartalmat, a teljes szervesszén-tartalmat, a szuszpendált szilárd anyagokat és bármely egyéb elvégzett mérés eredményét);

— vízminőség a tesztedényekben: pH-érték, keménység, hőmérséklet és az oldottoxigén-koncentráció,

— az etetésre vonatkozó részletes információk (pl. a táp(ok) típusa, forrása, az adagolt mennyiség és az etetés gyakorisága, valamint a lényeges szennyező anyagok elemzése (pl. PCB-k, PAH-k, és szerves klórt tartalmazó növényvédő szerek), ha rendelkezésre állnak.

Eredmények

— annak igazolása, hogy a kontrollok teljesítették a vizsgálat elfogadhatósági kritériumait;

— a vizsgálati koncentrációk és a kontrollok bármelyikében előforduló egyedpusztulásokra vonatkozó adatok;

— az alkalmazott statisztikai elemzési technikák, az adatok kezelése és az alkalmazott technikák indoklása;

— az általános morfológiára vonatkozó biológiai megfigyelések adatai, beleértve a másodlagos ivari jellegeket, az ikratermelést és a VTG-szintjét;

— az adatelemzés eredményei lehetőleg táblázatos és grafikus formában;

— a halak szokatlan reakcióinak és a vizsgálati vegyi anyag által előidézett bármely látható elváltozásnak az előfordulása.

▼M7

ÚTMUTATÓ A VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSÉHEZ ÉS ELFOGADÁSÁHOZ

51. Ez a szakasz olyan szempontokat tartalmaz, amelyeket figyelembe kell venni a különböző mért végpontok vizsgálati eredményeinek kiértékelése során. Az eredményeket körültekintően kell értelmezni, ha úgy tűnik, hogy a vizsgálati vegyi anyag nyilvánvaló toxicitást okoz vagy befolyásolja a kísérleti állatok általános állapotát.

52. A vizsgálati koncentrációk tartományának kijelölése során ügyelni kell arra, hogy ne lépjék túl a legnagyobb elviselhető koncentrációt, mert csak így lesz lehetőség az adatok megfelelő értelmezésére. Fontos, hogy legalább egy olyan kezelés legyen, ahol nincs jele toxikus hatásoknak. A betegség és a toxikus hatások jeleit alaposan meg kell vizsgálni és jegyzőkönyvezni kell. Lehetséges például, hogy a nőstényeknél a VTG termelését az általános toxicitás és a nem az endokrin rendszerre ható toxikus hatásmechanizmusok, pl. a hepatotoxicitás is befolyásolják. A hatások helyes értelmezését azonban segíthetik azok az egyéb kezelési szintek, amelyeket nem zavar a szisztémás toxicitás.

53. Van néhány szempont, amelyet figyelembe kell venni a vizsgálati eredmények elfogadása során. Útmutatásként a hímek és a nőstények kontrollcsoportjaiban mért VTG-szinteknek különbözőnek és egymástól körülbelül három nagyságrenddel eltérőnek kell lenniük az amerikai cselle és a zebradánió esetében, illetve körülbelül egy nagyságrenddel eltérőnek a japán rizshal esetében. A kontroll- és a kezelési csoportokban előforduló értéktartományokra a validálási jegyzőkönyvekben találhatók példák (1, 2, 3, 4). A kontrollcsoport hímjeinél mért magas VTG-értékek veszélyeztethetik a vizsgálat válaszkészségét és a gyenge ösztrogénagonisták felismerésére való képességét. A kontrollnőstényekben mért alacsony VTG-értékek veszélyeztethetik a vizsgálat válaszkészségét, illetve az aromatázgátlók és az ösztrogénantagonisták felismerésére való képességét. Ez az útmutatás a validálási vizsgálatok alapján készült.

54. Az ikratermelés mennyiségi meghatározását jelentős eltérések befolyásolják [a variációs koefficiens 20 és 60 % között mozoghat], amelyek hatással lehetnek arra, hogy a vizsgálat képes-e kimutatni az ikratermelés 70 %-nál kisebb mértékű jelentős csökkenését, ha a variációs koefficiens 50 %-hoz közelít vagy meghaladja azt. Amennyiben a variációs koefficienst le lehet alacsonyabb (20–30 % körüli) értékre szorítani, úgy a vizsgálat elfogadható statisztikai erővel (80 %) tudja kimutatni az ikratermelés 40–50 %-os csökkenését. Az amerikai cselle esetében alkalmazott, kezelési szintenként négy párhuzamost tartalmazó vizsgálati terv a fekunditási végpont tekintetében a mindössze két párhuzamost alkalmazó tervnél nagyobb statisztikai erőt biztosít.

55. Ha a laboratórium korábban még nem végezte a vizsgálatot vagy jelentős változások történtek (pl. a haltörzsben vagy a szállítóban), célszerű lefolytatni technikai jártassági vizsgálatot. Olyan vegyi anyagokat javasolt használni, amelyek különböző hatásmechanizmussal rendelkeznek vagy több vizsgálati végpontra is hatással vannak. A gyakorlatban a laboratóriumokat arra ösztönzik, hogy építsenek fel saját adatbázist a hímekre és a nőstényekre vonatkozó múltbeli kontrolladatokból, és hogy végezzenek pozitív kontrollvizsgálatot egy ösztrogénhatású vegyi anyaggal (pl. 17β-ösztradiollal 100 μg/l koncentrációban, vagy egy ismert gyenge agonistával), amely megnöveli a VTG szintjét a hím halakban, továbbá pozitív kontrollvizsgálatot végeznek egy aromatázgátló vegyi anyaggal (pl. fadrozollal vagy proklorazzal 300 μg/l koncentrációban), amely csökkenti a VTG szintjét a nőstény halakban, és pozitív kontrollvizsgálatot végeznek egy androgénhatású vegyi anyaggal (pl. 17β-trenbolonnal 5 μg/l koncentrációban), amely a másodlagos ivari jellegek megjelenését eredményezi a nőstény amerikai csellében és japán rizshalban. Ezeket az adatokat a laboratórium jártasságának igazolása céljából össze lehet hasonlítani a validációs vizsgálatokból (1, 2, 3) származó adatokkal.

56. A VTG-méréseket általában akkor kell pozitívnak tekinteni, ha – legalább a legmagasabb vizsgált dózisban – a VTG statisztikailag szignifikáns növekedése ($p < 0,05$) figyelhető meg a hímeknél vagy statisztikailag szignifikáns

▼M7

csökkenése ($p < 0,05$) figyelhető meg a nőstényeknél a kontrollcsoporttal összehasonlítva, általános toxicitásra utaló jelek nélkül. A pozitív eredményt még inkább alátámaszthatja a biológiai szempontból valószínűsíthető dózis–válasz összefüggés. Mint korábban említésre került, a VTG csökkenése nem feltétlenül teljesen endokrin eredetű; a pozitív eredményt azonban általában az *in vivo* endokrin hatás bizonyítékaként kell értelmezni, és rendszerint az eredmény tisztázása érdekében tett további intézkedések követik.

57. A szabályozó hatóságok előírhatják a gonadális kórszövettani vizsgálat értékelését a kísérleti állatok reprodukciós képességének meghatározása céljából, valamint hogy lehetővé tegyék a vizsgálati eredmények bizonyítékok súlyának mérlegelésén alapuló értékelését. Gonadális kórszövettani vizsgálat elvégzése nem feltétlenül szükséges olyan esetben, ha a VTG vagy a másodlagos ivari jellegek mérése pozitív eredményt mutat (vagyis a VTG-szint emelkedése vagy csökkenése, illetve a másodlagos ivari jellegek indukciója esetén).

SZAKIRODALOM

(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. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L., *et al* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences; 67(1):121-30.

▼M7

(11) Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

(13) Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

(17) Brion F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.

(19) Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.

(20) Ankley G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, *et al* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Paris.

(23) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. 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

1. függelék

RÖVIDÍTÉSEK ÉS FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

CV: variációs koefficiens

ELISA: enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay).

HPG-tengely: hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely.

Betelepítési arány: a halak nedvesen mért tömege egységnyi mennyiségű vízben.

MTC: legnagyobb elviselhető koncentráció, amely az LC_{50} körülbelül 10 %-a.

Állománysűrűség: a halak egy térfogategységre eső száma.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

VTG: a vitellogenin a szikben található foszfo-, lipo- és glikoproteinek prekurzora, amely alapesetben az ikrarakó fajok szexuálisan aktív nőstényeiben fordul elő.

▼M7

2. függelék

A HALAKBAN VÉGZETT ENDOKRIN SZŰRŐVIZSGÁLAT KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEI

1. Ajánlott fajok	Amerikai cselle (*Pimephales promelas*)	Japán rizshal (*Oryzias latipes*)	Zebradánió (*Danio rerio*)
2. Vizsgálattípus	Átfolyásos	Átfolyásos	Átfolyásos
3. Vízhőmérséklet	25 ± 2 °C	25± 2 °C	26 ± 2 °C
4. A megvilágítás minősége	Fluoreszcens izzók (széles spektrum)	Fluoreszcens izzók (széles spektrum)	Fluoreszcens izzók (széles spektrum)
5. Fényerősség	10–20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 000 lux vagy 50–100 ft-c (környezeti laboratóriumi szintek)	10–20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 000 lux vagy 50–100 ft-c (környezeti laboratóriumi szintek)	10–20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 000 lux vagy 50–100 ft-c (környezeti laboratóriumi szintek)
6. Megvilágítási időszak (hajnali/alkonyati átmeneti időszakok is alkalmazhatók, de nem feltétlenül szükségesek)	16 óra fény, 8 óra sötét	12–16 óra fény, 12–8 óra sötét	12–16 óra fény, 12–8 óra sötét
7. Betelepítési arány	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. A vizsgálati kamra mérete	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. A vizsgálati oldat térfogata	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. A vizsgálati oldatok térfogatának cseréje	Naponta legalább 6x	Naponta legalább 5x	Naponta legalább 5x
11. A vizsgált élőlények kora	Lásd a 21. pontot	Lásd a 21. pontot	Lásd a 21. pontot
12. A kifejlett halak nedvesen mért tömege hozzávetőleg (g)	Nőstények: 1,5 ± 20 % Hímek: 2,5 ± 20 %	Nőstények: 0,35 ± 20 % Hímek: 0,35 ± 20 %	Nőstények: 0,65 ± 20 % Hímek: 0,4 ± 20 %
13. Halak száma vizsgálati edényenként	6 (2 hím és 4 nőstény)	6 (3 hím és 3 nőstény)	10 (5 hím és 5 nőstény)
14. A kezelések száma	= 3 (plusz megfelelő kontrollok)	= 3 (plusz megfelelő kontrollok)	= 3 (plusz megfelelő kontrollok)
15. Az edények száma kezelésenként	Minimum 4	Minimum 4	Minimum 2
16. Halak száma vizsgálati koncentrációnként	16 felnőtt nőstény és 8 hím (4 nőstény és 2 hím minden párhuzamosban)	12 felnőtt nőstény és 12 hím (3 nőstény és 3 hím minden párhuzamosban)	10 felnőtt nőstény és 10 hím (5 nőstény és 5 hím minden párhuzamosban)
17. Etetési rend	Naponta két-három alkalommal (*ad libitum*) élő vagy fagyasztott kifejlett vagy nauplius sórák, kereskedelmi forgalomban kapható táp vagy ezek kombinációja	Naponta két-három alkalommal (*ad libitum*) nauplius sórák, kereskedelmi forgalomban kapható táp vagy ezek kombinációja	Naponta két-három alkalommal (*ad libitum*) nauplius sórák, kereskedelmi forgalomban kapható táp vagy ezek kombinációja

▼M7

18. Levegőztetés	Nincs, kivéve, ha az oldottoxigén-koncentráció a 60 %-os levegőtelítettség alá esik	Nincs, kivéve, ha az oldottoxigén-koncentráció a 60 %-os levegőtelítettség alá esik	Nincs, kivéve, ha az oldottoxigén-koncentráció a 60 %-os levegőtelítettség alá esik
19. Hígítóvíz	Tiszta felszíni víz, kútvíz, mesterséges víz vagy klórmentesített csapvíz	Tiszta felszíni víz, kútvíz, mesterséges víz vagy klórmentesített csapvíz	Tiszta felszíni víz, kútvíz, mesterséges víz vagy klórmentesített csapvíz
20. Expozíciót előkészítő időszak	7–14 nap ajánlott	7–14 nap ajánlott	7–14 nap ajánlott
21. Vizsgálati vegyi anyaggal történő expozíció időtartama	21 nap	21 nap	21 nap
22. Biológiai végpontok	— túlélési arány — viselkedés — termékenység — másodlagos ivari jellegek — VTG — választhatóan gonadális kórszövettani vizsgálat	— túlélési arány — viselkedés — termékenység — másodlagos ivari jellegek — VTG — választhatóan gonadális kórszövettani vizsgálat	— túlélési arány — viselkedés — termékenység — VTG — választhatóan gonadális kórszövettani vizsgálat
23. A vizsgálat elfogadhatósága	Az oldott oxigén a telítettség ≥ 60 %-a; az átlagos hőmérséklet 25 ± 2 °C; a halak 90 %-os túlélési aránya a kontrollokban; a mért vizsgálati koncentrációk a kezelési szintek átlagos mért értékeinek 20 %-os tartományán belül helyezkednek el.	Az oldott oxigén a telítettség ≥ 60 %-a; az átlagos hőmérséklet 25 ± 2 °C; a halak 90 %-os túlélési aránya a kontrollokban; a mért vizsgálati koncentrációk a kezelési szintek átlagos mért értékeinek 20 %-os tartományán belül helyezkednek el.	Az oldott oxigén a telítettség ≥ 60 %-a; az átlagos hőmérséklet 26 ± 2 °C; a halak 90 %-os túlélési aránya a kontrollokban; a mért vizsgálati koncentrációk a kezelési szintek átlagos mért értékeinek 20 %-os tartományán belül helyezkednek el.

▼M7

3. függelék

AZ ELFOGADHATÓ MINŐSÉGŰ HÍGÍTÓVÍZ NÉHÁNY FONTOSABB KÉMIAI TULAJDONSÁGA

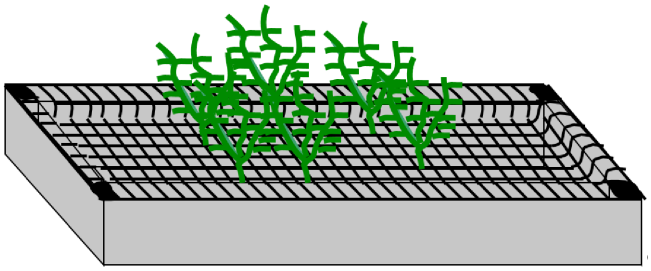
ÖSSZETEVŐ	KONCENTRÁCIÓ
Finomszemcsés anyag	< 20 mg/l
Teljes szervesszén-tartalom	< 2 mg/l
Ionizálatlan ammónia	< 1μg/l
Maradék klór	< 10 μg/l
Összes szerves foszfort tartalmazó növényvédő szer	< 50 ng/l
Szerves klórtartalmú peszticidek + poliklórozott bifenilek	< 50 ng/l
Összes szerves klór	< 25 ng/l

▼M7

4A.függelék

ÍVÁSI ALJZAT A ZEBRADÁNIÓ RÉSZÉRE

Ívási tálca: bármilyen, üvegből készült eszköztartó edény, például 22 × 15 × 5,5 cm méretű (hosszúság × szélesség × mélység), eltávolítható rozsdamentes acél ráccsal fedve (2 mm-es lyukbőség). A rácsnak a perem alatti magasságban kell fednie az eszköztartó edény nyílását.



A rácsra ívási aljzatot kell rögzíteni. A közegnek olyan szerkezetet kell biztosítania a halak részére, amelybe beköltözhetnek. A zöld műanyagból készült mesterséges akváriumnövények például alkalmasak erre a célra (megjegyzés: figyelembe kell venni a vizsgálati vegyi anyagnak a műanyaghoz való lehetséges adszorpcióját). A műanyagot elegendő ideig megfelelő mennyiségű meleg vízben kell áztatni, hogy ne bocsásson ki vegyi anyagokat a vizsgálati vízbe. Üvegből készült anyagok használata esetén biztosítani kell, hogy a halak intenzív mozgásuk során ne sérüljenek meg vagy szoruljanak be.

A tálca és az üvegfalak közötti távolság legalább 3 cm legyen, hogy az ívás ne történhessen a tálcán kívül. A tálcára lerakott ikrák átesnek a rácson, és 45–60 perccel a megvilágítás kezdete után mintát lehet venni belőlük. Az átlátszó ikrák nem tapadnak, és keresztirányú fény segítségével könnyen meg lehet számolni őket. Edényenként öt nőstény használata esetén a legfeljebb 20 ikra/nap mennyiség alacsonynak, a legfeljebb 100 ikra/nap mennyiség közepesnek, a több mint 100 ikra/nap mennyiség pedig magasnak számít. Az ívási tálcát – a lehető legkésőbbi esti időpontban vagy kora reggel – el kell távolítani, az ikrákat össze kell gyűjteni, majd az ívási tálcát újra be kell helyezni a vizsgálati edénybe. Az újrabehelyezésig eltelt idő nem haladhatja meg az egy órát, különben az ívási aljzat hatása szokatlan időben jelentkező egyedi párzást és ívást válthat ki. Ha valamilyen körülmény az ívási tálca későbbi behelyezését teszi szükségessé, ezt legalább 9 órával a megvilágítás kezdete után kell megtenni. E késői napszakban a tálca behelyezése már nem vált ki ívást.

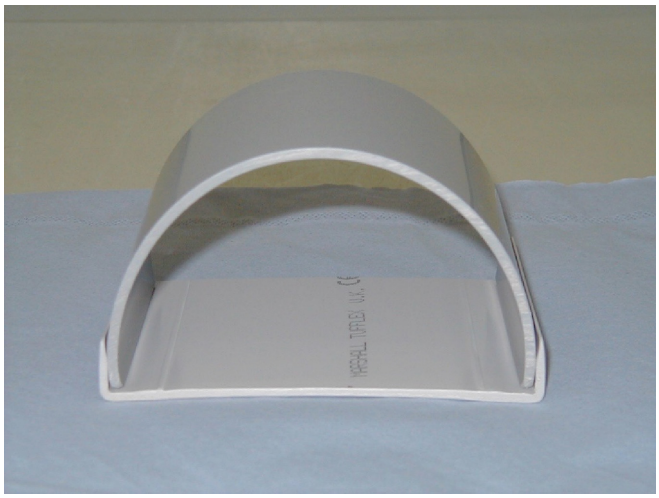
▼M7

4B. függelék

ÍVÁSI ALJZAT AMERIKAI CSELLE RÉSZÉRE

Két vagy három kombinált műanyag/kerámia/üveg vagy rozsdamentes acél ívási lemezt és tálcát kell helyezni mindegyik vizsgálati kamrába (pl. 80 mm hosszú szürke, félkör alakú ereszcsatorna-darab egy 130 mm hosszú szegélyes tálcára helyezve) (lásd a képet). A megfelelően kezelt PVC- vagy kerámialemezek megfelelő ívási aljzatnak bizonyultak (Thorpe *et al*, 2007.).

A jobb tapadás érdekében ajánlott a lemezeket megcsiszolni. Emellett a tálcát célszerű hálóval lefedni azt megakadályozandó, hogy a halak hozzáférjenek a lehullott ikrákhoz, kivéve, ha igazolt, hogy az ikrák hatékonyan tapadnak a használt ívási aljzathoz.



Az alaplap célja, hogy felfogja azokat az ikrákat, amelyek nem tapadnak meg a lemez felületén és ezért a tartály aljára esnének (vagy azokat az ikrákat, amelyeket a halak közvetlenül a lapos műanyag alaplapra raktak le). Az ívási aljzatot felhasználás előtt legalább 12 órán keresztül áztatni kell a hígítóvízben.

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

5A. függelék

A MÁSODLAGOS IVARI JELLEGEK VIZSGÁLATA AZ AMERIKAI CSELLÉBEN BIZONYOS ENDOKRIN RENDSZERRE HATÓ VEGYI ANYAGOK KIMUTATÁSA CÉLJÁBÓL

Áttekintés

A hormonháztartást zavaró anyagok vizsgálata során a fizikai megjelenés potenciálisan fontos jellemzői lehetnek a felnőtt amerikai csellék esetében többek között: a testszín (azaz világos/sötét), a mintázat (azaz a függőleges sávok jelenléte vagy hiánya), a test alakja (azaz a fej és a pektorális régió alakja, a has puffadtsága), valamint a speciális másodlagos ivari jellegek (azaz a nászkiütések száma és mérete, a dorzális lemez és a tojócső mérete).

A nászkiütések a szaporodásbiológiailag aktív hím amerikai csellék fején (dorzális lemez) találhatók, és általában kétoldali szimmetrikus mintázatba rendeződnek (Jensen *et al*. 2001). A kontrollnőstényeken, illetve a növendék hímeken és nőstényeken nem figyelhető meg a nászkiütések kifejlődése (Jensen *et al*. 2001). A hímek szeme körül és orrlyukai között akár nyolc egyedi nászkiütés is lehet. A legtöbb és legnagyobb nászkiütés közvetlenül az orrlyukak alatt és a száj fölött, két párhuzamos vonalban található. Számos halban nászkiütéscsoportok helyezkednek el az alsó állkapocs alatt; ezek közül a szájhoz legközelebb elhelyezkedők általában egy különálló párt alkotnak, míg a ventrálisabb csoportok akár négy nászkiütésből is állhatnak. A gyakorlatban a nászkiütések száma ritkán haladja meg a 30-at (tartomány: 18–28; Jensen *et al*. 2001). A (számuk tekintetében) domináns nászkiütések különálló, viszonylag kerek képződmények, amelyek magassága körülbelül megegyezik a sugarukkal. A szaporodásbiológiailag aktív hímek többségének van legalább néhány olyan nászkiütése, amely olyan mértékben megnagyobbodott és hangsúlyossá vált, hogy az egyes struktúrákat nem lehet megkülönböztetni.

A hormonháztartást zavaró anyagok bizonyos típusai egyes másodlagos ivari jellegek rendellenes előfordulását okozhatják a másik nemben; például az androgénreceptor-agonisták – mint a 17α-metiltesztoszteron vagy a 17β-trenbolon – nászkiütések kifejlődését okozhatják a nőstény amerikai csellénél (Smith, 1974; Ankley *et al*. 2001, 2003), míg az ösztrogénreceptor-agonisták a hímeknél csökkenhetik a nászkiütések számát vagy méretét (Miles–Richardson *et al*. 1999; Harris *et al*. 2000.).

Az alábbiakban az Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynökségének (US Environmental Protection Agency) duluth-i (Minnesota állam) laboratóriumában alkalmazott eljárások alapján ismertetjük a nászkiütések jellemzését az amerikai cselle esetében. Az egyes termékek és/vagy berendezések hasonló rendelkezésre álló anyagokkal is helyettesíthetők.

A nászkiütések megfigyelésére leginkább megvilágított nagyító vagy 3X nagyítású megvilágított preparálómikroszkóp alkalmas. A halat dorzális irányból és anterior részével előre kell vizsgálni (fejjel a megfigyelő felé).

— A halat anterior részével előre és ventrális részével lefelé kis (pl. 100 mm átmérőjű) Petri-csészébe kell helyezni. A keresőt fókuszálni kell, hogy a nászkiütésekbeazonosíthatók legyenek. A halat lassan, finoman egyik oldaláról a másikra kell forgatni a nászkiütés-területek beazonosítása érdekében. A nászkiütéseket meg kell számolni és pontozni kell.

— A megfigyelést a fej ventrális felületén is meg kell ismételni úgy, hogy a halat hátára fektetve, anterior részével előre helyezik a Petri-csészébe.

— Az egyes halak megfigyelését 2 percen belül be kell fejezni.

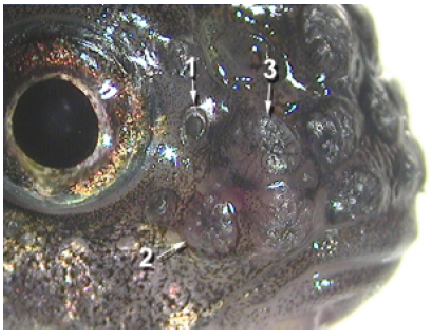
▼M7

A nászkiütések megszámlálása és pontozása

Felnőtt amerikai cselle esetében hat specifikus területet határoztak meg, ahol meg kell vizsgálni a nászkiütések jelenlétét és fejlődését. A jelenlévő nászkiütések elhelyezkedésének és mennyiségének feltérképezésére kifejlesztettek egy sablont (lásd a függelék végén). Az egyes élőlények esetében a nászkiütések számát rögzíteni kell, méretüket a következőképpen lehet mennyiségileg rangsorolni: 0 – hiányzik, 1– jelen van, 2 – megnagyobbodott és 3 – hangsúlyos (1. ábra).

0 pont – hiányoznak a nászkiütések. 1 pont – jelen van, és a tuberkulumnak van egy olyan pontja, amelynek magassága csaknem egyenlő a nászkiütés sugarával. 2 pont – megnagyobbodott, megjelenésében csillagra emlékeztető szövet jellemzi, és rendszerint nagy sugaras alapja van a középpontból eredő bordákkal vagy barázdákkal. A nászkiütés felszíne gyakran egyenetlen, de időnként kissé lekerekedett is lehet. 3 pont – hangsúlyos, általában elég nagy és lekerekedett, kevésbé definiált struktúrával. Időnként ezek a nászkiütések összefutnak és egy adott területen vagy különböző területek kombinációján összefüggő tömeget képeznek (B, C és D, alább ismertetve). A nászkiütések színezete és struktúrája a 2 ponttal értékelt nászkiütéséhez hasonlít, de időnként eléggé megkülönböztethetetlen. Ez a pontozási rendszer a 18–20 nászkiütéssel rendelkező normál kontrollhímek esetében általában < 50 általános nászkiütés-pontszámot eredményez (Jensen *et al*. 2001).

1. ábra



Az adott minősítési területen lévő nászkiütések tényleges száma néhány hal esetében meghaladhatja a sablon celláinak számát. Ilyen esetben a további pontszámokat a cellán belül, illetve a cellától jobbra vagy balra lehet megadni. A sablonnak ezért nem kell szimmetrikusnak lennie. További technika a párban álló vagy a száj vízszintes síkja mentén vertikálisan összekapcsolódott nászkiütések feltérképezésére, hogy egy cellában két nászkiütés-minősítő pontszámot adnak meg.

Feltérképezendő régiók:

A – a szem körül található nászkiütések. A szem elülső pereme körül dorzoventrális irányban feltérképezve. A kifejlett kontrollhímeknél általában több is található, a kontrollnőstényeknél nincsenek jelen, az androgénnek kitett nőstényekben pedig általában párban (mindkét szem közelében egy pár) vagy önállóan fordulnak elő.

B-az orrnyílások (szenzoros csatorna pórusok) között találhatók nászkiütések. A kontrollhímeknél normális esetben párokban, magasabb fejlettségi szintjen (2 – megnagyobbodott vagy 3 – hangsúlyos) fordulnak elő. A kontrollnőstényeknél nincsenek jelen, az androgéneknek kitett nőstényeknél alkalmanként előfordulnak és bizonyos mértékben fejlettek.

C – az orrlyukaktól közvetlenül anterior irányban, a szájjal párhuzamosan található nászkiütések. A kifejlett kontrollhímekben általában megnagyobbodtak vagy hangsúlyosak. A kevésbé fejlett hímekben vagy az androgénnel kezelt nőstényekben jelen vannak vagy megnagyobbodtak.

▼M7

D – a szájvonallal párhuzamosan elhelyezkedő nászkiütések. A kontrollhímeknél általában fejlettnek minősülnek. A kontrollnőstények esetében hiányoznak, de az androgénnek kitett nőstényeknél jelen vannak.

E – az alsó állkapcson, a száj közelében található nászkiütések, általában kisméretűek és gyakran párban vannak. A kontroll- és a kezelt hímek, valamint a kezelt nőstények esetében változó jellemzőkkel rendelkeznek.

F – az E-vel jelölt nászkiütésektől ventrálisan elhelyezkedő nászkiütések. Gyakran kisméretűek és párban vannak. A kontrollhímeknél és az androgénnek kitett nőstényeknél vannak jelen.

Hivatkozások:

(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.

Nászkiütés-sablon:

AZONOSÍTÓ _____

Dátum ____

Összesített pontszám _____

Számszerű értékelés

1-jelen van

2-megnagyobbodott

3-hangsúlyos

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

		E	**X1**	**X1**	
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

▼M7

5B. függelék

A MÁSODLAGOS IVARI JELLEGEK VIZSGÁLATA A JAPÁN RIZSHALBAN EGYES, AZ ENDOKRIN RENDSZERRE HATÓ VEGYI ANYAGOK KIMUTATÁSA CÉLJÁBÓL

Az alábbiakban a papilláris nyúlványok ([1]) mérési módját ismertetjük, amelyek a japán rizshal (*Oryzias latipes*) jellemző másodlagos ivari jellegei.

(1) A máj kimetszése után (6. függelék) a tetemet egy kúpos csőbe kell helyezni, amely körülbelül 10 ml 10 %-os semleges pufferelt formalint tartalmaz (felső rész: fej, alsó rész: farok). Ha az ivarmirigyet 10 %-os semleges pufferelt formalintól eltérő oldatban fixálják, a testet keresztirányban kell átvágni borotvapenge segítségével a farok alatti úszó anterior régiója és a végbélnyílás között, ügyelve arra, hogy ne sértsék meg az ivarnyílást és magát az ivarmirigyet (3. ábra). A haltest feji végét fixálóoldatba kell helyezni az ivarmirigy megőrzése céljából, a haltest farki végét pedig – a fent leírtak szerint – 10 %-os semleges pufferolt formalinba.

(2) Miután a haltestet 10 %-os semleges pufferelt formalinba helyezték, csipesszel meg kell fogni a farok alatti úszó anterior régióját és meghajlítva kell tartani körülbelül 30 másodpercig, hogy a farok alatti úszó nyitva maradjon. A farok alatti úszó csipesszel való megfogása során csak néhány úszósugarat szabad meg fogni az anterior régióban, ügyelve arra, hogy a papilláris nyúlványok ne karcolódjanak meg.

(3) Miután körülbelül 30 másodpercig nyitva tartották a farok alatti úszót, a haltestet a papilláris nyúlványok méréséig 10 %-os semleges pufferolt formalinban kell tárolni szobahőmérsékleten (a mérést legalább 24 órával a fixálás után kell elvégezni).

Mérés

(1) Miután a hal testét legalább 24 órán keresztül fixálták 10 %-os semleges pufferelt formalinban, a haltestet ki kell venni a kúpos csőből, és a formalint szűrőpapírral (vagy papírtörlővel) le kell törölni.

(2) A halat hassal felfelé kell elhelyezni. Kisméretű boncolóollóval óvatosan le kell vágni a farok alatti úszót (célszerű a farok alatti úszót a pterygiophorus kis darabjával együtt levágni).

(3) Csipesszel meg kell fogni a levágott, farok alatti úszót az anterior régióban, és néhány csepp vízzel üveg tárgylemezre kell helyezni. Ezután le kell fedni a farok alatti úszót egy üveg fedőlemezzel. Vigyázni kell, hogy ne karcolják meg a papilláris nyúlványokat, amikor a farok alatti úszót a csipesszel megfogják.

(4) A számláló segítségével meg kell számolni a papilláris nyúlványokkal rendelkező összekapcsolódott lemezeket biológiai mikroszkóp (álló mikroszkóp vagy inverz mikroszkóp) alatt. A papilláris nyúlvány arról ismerhető fel, hogy egy kis nyúlvány kialakulása látható az összekapcsolódott lemez poszterior szélén. A munkalapra fel kell jegyezni a papilláris nyúlvánnyal rendelkező összekapcsolódott lemezek számát minden úszósugáron (pl. első úszósugár: 0, második úszósugár: 10, harmadik úszósugár: 12, stb.), és halanként fel kell jegyezni ezeknek a számoknak az összegét az Excel-munkalapon.

([1]) A papilláris nyúlványok normális esetben csak felnőtt hímeknél jelennek meg és a farok alatti úszó sugarain, az úszó poszterior végétől számított másodiktól a hetedik vagy nyolcadik úszósugárig találhatók meg (1. és 2. ábra). A nyúlványok ugyanakkor csak ritkán jelennek meg a farok alatti úszó poszterior végétől számított első úszósugáron. Ez a szabványműveleti előírás kiterjed a nyúlványok első úszósugáron történő mérésére is (ebben a szabványműveleti előírásban az úszósugarak számjele a farok alatti úszó poszterior végétől számított sorszámukra utal).

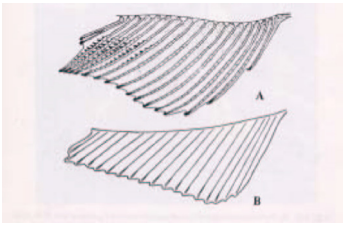
▼M7

Szükség esetén le kell fényképezni a farok alatti úszót, és a fényképen meg kell számolni a papilláris nyúlvánnyal rendelkező összekapcsolódott lemezeket.

(5) A mérés után tárolás céljából a farok alatti úszót az (1) pontban leírt kúp alakú csőbe kell helyezni.

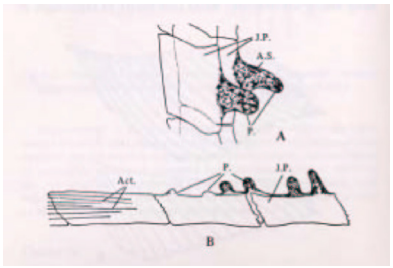
1. ábra

A farok alatti úszó alakjában és méretében megfigyelhető, ivarok közötti különbséget bemutató ábra. A, hím; B, nőstény. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



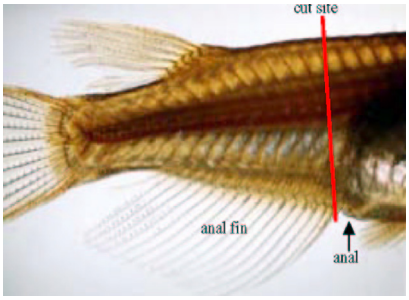
2. ábra

A: nyúlványok a farok alatti úszósugár összekapcsolódott lemezein. J.P.: összekapcsolódott lemez; A.S.: axiális tér; P.: nyúlvány. B.: az úszósugár disztális vége. Actinotrichia (Act.) az úszósugár hegyén. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



3. ábra

A hal testéről készült fénykép a kettévágás helyével, ha az ivarmirigyet 10 %-os semleges pufferelt formalintól eltérő fixálóoldatban fixálják. Ebben az esetben a testet a farok alatti úszó anterior régiója és a végbélnyílás között borotva segítségével ketté kell vágni (piros vonal), majd a haltest feji része az ivarmirigy-fixálóoldatba, míg a haltest farki része 10 %-os semleges pufferelt formalinba kerül.



▼M7

6. függelék

A VITELLOGENININANALÍZIS CÉLJÁRA AJÁNLOTT MINTAVÉTELI ELJÁRÁSOK

Ügyelni kell arra, hogy elkerüljék a hímekből és nőstényekből vett VTG-minták közötti keresztszennyeződést.

1A. eljárás: Amerikai cselle, vérvétel farokvénából/-artériából

Érzéstelenítés után a faroktestet szikével részben át kell vágni, és heparinnal kezelt mikrohematokrit kapilláriscsővel vért kell gyűjteni a farokvénából/-artériából. A vér levételét követően a vérplazmát 3 percig 15 000 *g* -vel (vagy alternatív megoldásként 10 percig 15 000 *g*-vel 4 °C-on) történő centrifugálással gyorsan el kell választani. Centrifugálás után szükség esetén meg lehet határozni a százalékos hematokritértéket. A plazmarészt ezután el kell távolítani a mikrohematokrit csőből, és 0,13 egység aprotinin (proteáz-inhibitor) hozzáadása után a VTG-meghatározás elvégzéséig centrifugacsőben, – 80 °C hőmérsékleten kell tárolni. A begyűjthető vérplazmatérfogat az amerikai cselle méretétől függően (ami ivarfüggő) általában 5–60 mikroliter/hal (Jensen *et al.* 2001).

1B. eljárás: Amerikai cselle, vérvétel szívpunkcióval

Alternatív megoldásként a vér szívpunkcióval is gyűjthető heparinnal kezelt fecskendő használatával (1 000 egység heparin/ml). A vért (jégen tartott) Eppendorf-csövekbe kell áttölteni, majd centrifugálni (5 perc, 7 000 *g*, szobahőmérséklet). A vérplazmát tiszta Eppendorf-csövekbe kell áttölteni (alikvotokban, ha a vérplazma térfogata ezt lehetővé teszi), majd -80 °C-on azonnal le kell fagyasztani és az analízisig így tárolni (Panter *et al*. 1998).

2 A. eljárás: Japán rizshal, a máj kimetszése a rizshal esetében

A vizsgálati halak eltávolítása a vizsgálati kamrából

(1) A vizsgálati halakat kis merítőhálóval kell eltávolítani a vizsgálati kamrából. Vigyázni kell, hogy ne ejtsék bele a vizsgálati halakat egy másik vizsgálati kamrába.

(2) A vizsgálati halakat elvileg a következő sorrendben kell eltávolítani: kontroll, oldószeres kontroll (adott esetben), legalacsonyabb koncentráció, közepes koncentráció, legmagasabb koncentráció és pozitív kontroll. Ezenkívül az összes hímet el kell távolítani a vizsgálati kamrából, mielőtt a nőstények eltávolítására sor kerülne.

(3) A vizsgálati halak ivarát a külső másodlagos ivari jellegek alapján kell megállapítani (pl. a farok alatti úszó alakja).

(4) A vizsgálati halakat szállítótartályba kell helyezni, és a máj kimetszésére szolgáló munkaállomásra kell átvinni. Ellenőrizni kell, hogy a vizsgálati kamra és a szállítótartály címkéje pontos adatokat tartalmaz-e, illetve meg kell erősíteni, hogy a vizsgálati kamrából eltávolított halak száma és a kamrában maradó halak száma összhangban van-e az elvárttal.

(5) Ha az ivart a halak külső megjelenése alapján nem lehet azonosítani, el kell távolítani az összes halat a vizsgálati kamrából. Ebben az esetben az ivart az ivarmirigy vagy a másodlagos ivari jellegek sztereomikroszkóp alatti megfigyelésével kell meghatározni.

A máj kimetszése

(1) A vizsgálati halat kis merítőhálóval át kell helyezni a szállítótartályból az érzéstelenítő oldatba.

▼M7

(2) Érzéstelenítés után a vizsgálati halakat csipesszel (kereskedelmi forgalomban kapható típus) szűrőpapírra (vagy papírtörlőre) kell helyezni. A vizsgálati halat a fej két oldalán kell megfogni a csipesszel, hogy elkerülhető legyen a farok eltörése.

(3) Le kell törölni a vizet a szűrőpapírral (vagy a papírtörlővel) a vizsgálati hal testének felületéről.

(4) A halat hassal felfelé kell elhelyezni. Boncolóollóval kis keresztirányú bemetszést kell ejteni félúton a ventrális nyaki régió és a középhasi régió között.

(5) A boncolóollót a kis bemetszésbe kell vezetni, majd a kopoltyúfedőtől kaudális irányban elhelyezkedő ponttól a végbélnyílás kraniális széléig fel kell vágni a hasat a has középvonala mentén. Vigyázni kell, hogy ne vezessék be túl mélyen a boncolóollót, nehogy károsodjon a máj és az ivarmirigy.

(6) A következő műveleteket sztereomikroszkóp alatt kell végezni.

(7) A vizsgálati halat hassal felfelé a papírtörlőre kell helyezni (üveg Petri-csésze vagy tárgylemez is rendelkezésre áll).

(8) Precíziós csipesszel szét kell húzni a hasüreg falait, és fel kell tárni a belső szerveket. Szükség esetén az is elfogadható, ha a belső szerveket a hasüreg egyik falának eltávolításával tárják fel.

(9) Egy másik precíziós csipesszel fel kell tárni a máj és az epehólyag kapcsolódó részét. Ezután meg kell fogni az epevezetéket, majd le kell vágni az epehólyagot. Vigyázni kell, nehogy kilyukasszák az epehólyagot.

(10) Meg kell fogni a nyelőcsövet, és ugyanígy le kell vágni a gyomor-bél traktust a májról. Vigyázni kell, nehogy kiszivárogjon a gyomor- és béltartalom. A kaudális gyomor-bél traktust le kell vágni a végbélnyílásról, és el kell távolítani a hasüregből.

(11) A zsírt és az egyéb szöveteket le kell metszeni a májperifériáról. Vigyázni kell, nehogy felsértsék a májat.

(12) A máj portális területét a precíziós csipesszel meg kell fogni, és a májat el kell távolítani a hasüregből.

(13) A májat a tárgylemezre kell helyezni. Szükség esetén a máj felületéről precíziós csipesszel el kell távolítani minden további zsírt és külső szövetet (pl. hasüreget bélelő szövetek).

(14) Elektronikus analitikai mérlegen meg kell mérni a máj tömegét 1,5 ml-es mikrocsővel mint tárával együtt. Az értéket fel kell jegyezni a munkalapra (leolvasás: 0,1 mg pontossággal). A mikrocső címkéjén található azonosító adatokat ellenőrizni kell.

(15) Le kell zárni a májat tartalmazó mikrocső kupakját. A csövet hűtőállványon (vagy fagyasztótartályban) kell tárolni.

(16) A máj kimetszése után a boncolóeszközöket meg kell tisztítani, vagy le kell cserélni azokat tiszta eszközökre.

▼M7

(17) A szállítótartályban található minden halból a fent leírtak szerint el kell távolítani a májat.

(18) Miután a szállítótartályban lévő összes halból kivágták a májat (azaz az adott vizsgálati kamrából származó minden hímből vagy nőstényből), az összes májmintát azonosító címkével ellátva csőtartó állványra kell helyezni, majd fagyasztóban tárolni. Ha a májakat kimetszés után nem sokkal előkezelésre bocsátják, a mintadarabokat hűtőállványon (vagy fagyasztótartályban) át kell vinni a következő munkaállomásra.

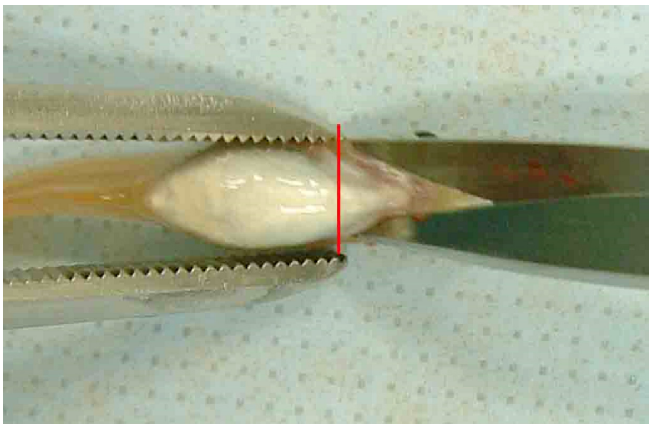
A hal teste a máj kimetszését követően felhasználható ivarmirigy-szövettanra és a másodlagos ivari jellegek vizsgálatára.

Mintapéldány

Ha a vizsgálati halakból vett májmintákat röviddel a kimetszés után nem használják fel előkezelésre, akkor ≤ – 70 °C-on kell azokat tárolni.

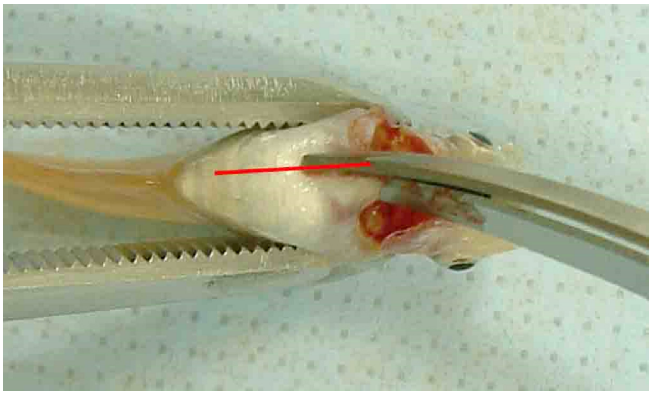
1. ábra

Ollóval bemetszést kell ejteni közvetlenül a mellúszók előtt.



2. ábra

A has középvonalát a végbélnyílástól körülbelül 2 mm-re kraniálisan elhelyezkedő pontig ollóval fel kell vágni.



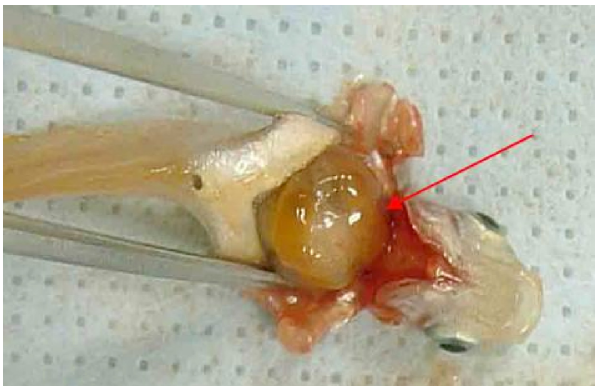
▼M7

3. ábra

A hasfalat a máj és az egyéb belső szervek szabaddá tétele céljából fogóval ki kell tárni.

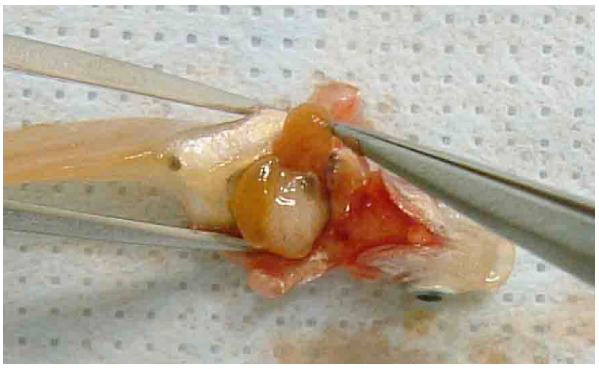
(Alternatív megoldásként a hasfalat oldalra is le lehet tűzni.)

A nyíl a májat jelzi.



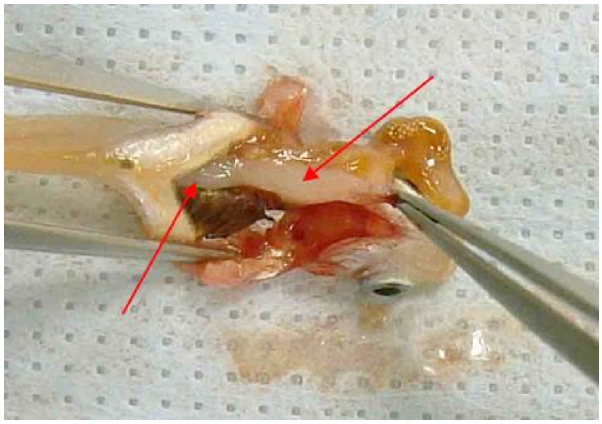
4. ábra

A májat fogóval határozottan fel kell tárni és kimetszeni.



5. ábra

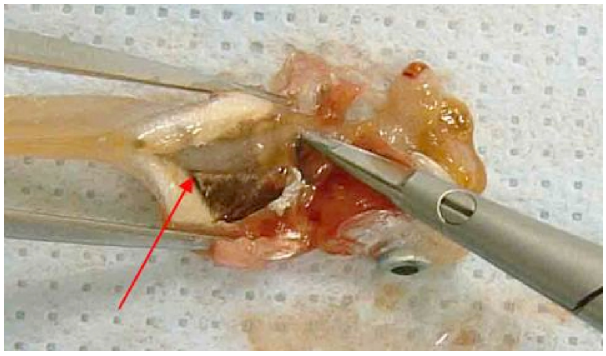
A beleket fogóval óvatosan vissza kell húzni.



▼M7

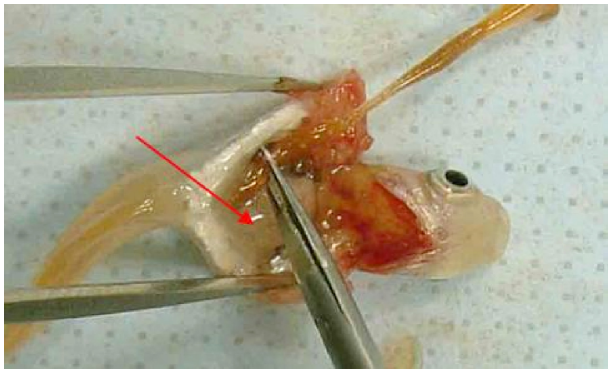
6. ábra

A belek mindkét végét és a mesenterialis függelékeket ollóval el kell vágni.



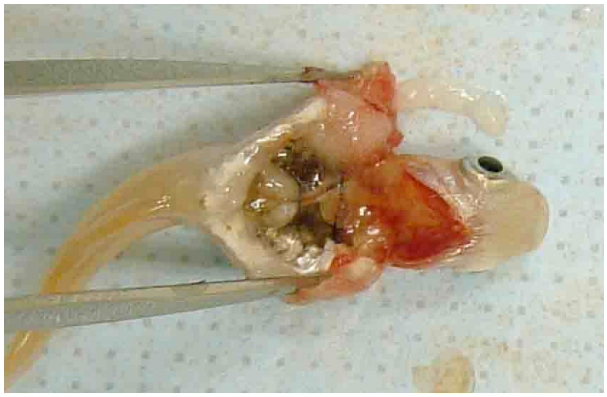
7. ábra (nőstény)

Az eljárás a nőstények esetében is ugyanaz.



8. ábra

A befejezett eljárás.



▼M7

2B. eljárás: Japán rizshal (*Oryzias latipes*), a máj előkezelése vitellogeninanalízishez

A homogenizátumpuffert ki kell venni az ELISA-készletből, és az üvegében hagyva zúzott jéggel le kell hűteni (az oldat hőmérséklete: ≤ 4 °C). Ha az EnBio ELISA rendszer homogenizáló pufferét használják, az oldatot szobahőmérsékleten fel kell olvasztani, majd a palackot zúzott jéggel lehűteni.

A májhoz szükséges homogenizátumpuffer térfogatát a máj tömege alapján kell kiszámítani (egy mg májhoz 50 µl homogenizátumpuffert kell adni). Például ha a máj tömege 4,5 mg, a májhoz adandó homogenizátumpuffer mennyisége 225 µl. Listát kell készíteni az összes májhoz szükséges homogenizátumpuffer térfogatáról.

A máj előkészítése az előkezeléshez

(1) A májat tartalmazó 1,5 ml-es mikrocsövet közvetlenül az előkezelés előtt kell kivenni a fagyasztóból.

(2) A vitellogeninszennyeződés megelőzése érdekében a hímekből származó májak előkezelését a nőstényekből származó májak előkezelése előtt kell elvégezni. Ezen túlmenően a vizsgálati csoportok előkezelését a következő sorrendben kell lefolytatni: kontroll, oldószeres kontroll (adott esetben), legalacsonyabb koncentráció, közepes koncentráció, legmagasabb koncentráció és pozitív kontroll.

(3) A fagyasztóból egy adott időpontban kivett – májmintákat tartalmazó – 1,5 ml-es mikrocsövek száma nem haladhatja meg az abban az időpontban lecentrifugálható mikrocsövek számát.

(4) A májmintákat tartalmazó 1,5 ml-es mikrocsöveket a mintadarabok sorszámai szerinti sorrendben kell elrendezni a fagyasztótartályban (a májakat nem kell felolvasztani).

Az előkezelés végrehajtása

1) A homogenizátumpuffer hozzáadása

A listán ellenőrizni kell a homogenizátumpuffernek az adott májmintához használandó térfogatát, és be kell állítani a mikropipettát (térfogattartomány: 100–1 000 µl) a megfelelő térfogatra. A mikropipettához tiszta hegyet kell csatlakoztatni.

A homogenizátumpuffert fel kell szívni a reagenspalackból, és a puffert be kell adni a májat tartalmazó 1,5 ml-es mikrocsőbe.

A májat tartalmazó valamennyi 1,5 ml-es mikrocsőbe be kell adni a homogenizátumpuffert a fent leírt eljárás szerint. A mikropipetta hegyét nem kell kicserélni. Ha azonban a pipettahegy szennyezett vagy feltehetően szennyezett, a hegyet ki kell cserélni.

2) A máj homogenizálása

— A homogenizáláshoz új mozsártörőt kell csatlakoztatni a mikrocső-homogenizátorhoz.

— A mozsártörőt be kell vezetni a 1,5 ml-es mikrocsőbe. A mikrocső-homogenizátort úgy kell tartani, hogy a májat a mozsártörő felülete és a 1,5 ml-es mikrocső belső fala közé préselje.

— A mikrocső-homogenizátort 10–20 másodpercre be kell kapcsolni. A művelet során a 1,5 ml-es mikrocsövet zúzott jéggel kell hűteni.

▼M7

— Ki kell emelni a mozsártörőt a 1,5 ml-es mikrocsőből, és a csövet körülbelül 10 másodpercig nyugalomban kell hagyni. Ezután vizuálisan ellenőrizni kell a szuszpenzió állapotát.

— Ha májdarabok figyelhetők meg a szuszpenzióban, a (3) és (4) műveletet meg kell ismételni, hogy kielégítő minőségű májhomogenizátumot lehessen készíteni.

— A centrifugálásig a szuszpendált májhomogenizátumot fagyasztótartályban kell hűteni.

— A mozsártörőt minden homogenizátumhoz újra kell cserélni.

— Az összes májat homogenizálni kell a homogenizátumpufferrel a fent leírt eljárás szerint.

3) A szuszpendált májhomogenizátum centrifugálása

— A hűtött centrifugakamra hőmérsékletét ellenőrizni kell (≤ 5 °C.).

— A szuszpendált májhomogenizátumot tartalmazó 1,5 ml-es mikrocsöveket be kell helyezni a hűtött centrifugába (szükség esetén ki kell egyensúlyozni).

— A szuszpendált májhomogenizátumot 10 percig centrifugálni kell ≤ 5 °C hőmérsékleten 13 000 *g*-vel. Ugyanakkor, ha a felülúszók megfelelően elválnak, a centrifugálás sebességét és időtartamát szükség szerint módosítani lehet.

— A centrifugálás után ellenőrizni kell, hogy a felülúszók megfelelően elkülönültek-e (felszín: lipid, középső réteg: felülúszó, alsó réteg: májszövet). Ha az elkülönülés nem megfelelő, azonos körülmények mellett ismét centrifugálni kell a szuszpenziót.

— El kell távolítani minden mintadarabot a hűtött centrifugából, és azokat a mintadarabok sorszámának megfelelően kell elhelyezni a fagyasztótartályban. Vigyázni kell, nehogy a centrifugálás után újraszuszpendálják a már elválasztott rétegeket.

4) A felülúszó gyűjtése

— A csőtartó állványba négy db 0,5 ml-es mikrocsövet kell helyezni a felülúszó tárolására.

— Mikropipettával 30 µl-t kel kivenni minden felülúszóból (a középső rétegben különül el), és 0,5 ml-es mikrocsőbe kell áttölteni. Vigyázni kell, hogy ne szívják fel a felszínen található lipidet vagy az alsó rétegben található májszövetet.

— A fentebb leírtakkal megegyező módon kell kivenni a felülúszóból, és be kell tölteni két másik 0,5 ml-es mikrocsőbe.

— A maradék felülúszót be kell gyűjteni a mikropipettával (lehetőség szerint: ≥ 100 µl). Ezután a felülúszót a fennmaradó 0,5 ml-es mikrocsőbe kell tölteni. Vigyázni kell, hogy ne szívják fel a felszínen található lipidet vagy az alsó rétegben található májszövetet.

— Le kell zárni a 0,5 ml-es mikrocső kupakját, és a címkére rá kell írni a felülúszó térfogatát. Ezután azonnal le kell hűteni a mikrocsöveket a fagyasztótartályban (ice rack).

— A mikropipetta hegyét minden felülúszónál újra kell cserélni. Ha nagy mennyiségű lipid halmozódik fel a mikropipetta hegyén, a májkivonat zsírral való szennyeződésének elkerülése érdekében azonnal le kell cserélni egy új hegyre.

▼M7

— Az összes lecentrifugált felülúszót szét kell osztani négy 0,5 ml-es mikrocsőbe a fent leírt eljárás szerint.

— A felülúszó 0,5 ml-es mikrocsövekbe történő szétöntését követően az azonosító címkével ellátott mikrocsöveket a csőtartó állványba kell helyezni, majd fagyasztóban azonnal lefagyasztani. Ha a VTG koncentrációját az előkezelés után azonnal mérik, a csőtartó állványban egy 0,5 ml-es mikrocsövet (a 30 µl felülúszót tartalmazó csövet) hűvösen kell tartani, és át kell vinni arra a munkaállomásra, ahol az ELISA-vizsgálatot végzik. Ebben az esetben a többi mikrocsövet csőtartó állványba kell helyezni, és le kell fagyasztani a fagyasztóban.

— A felülúszó begyűjtését követően a maradékot megfelelően meg kell semmisíteni.

A minta tárolása

A májhomogenizátum felülúszóját tartalmazó 0,5 ml-es mikrocsöveket az ELISA-vizsgálatban történő felhasználásig ≤ – 70 °C-on kell tárolni.

3A. eljárás: Zebradánió, vérvétel farokvénából/-artériából

A faroktövet közvetlenül az érzéstelenítés után keresztben át kell vágni, és heparinnal kezelt mikrohematokrit kapilláriscsővel fel kell fogni a vért a farokvénából/-artériából. A vér térfogata a hal méretétől függően 5–15 µl. A mikrokapilláris-csőbe azonos térfogatú aprotinin puffert (6 µg/ml PBS-ben) kell adni, és a vérplazmát centrifugálással (5 perc, 600 *g*) szeparálni a vérből. A vérplazmát a kémcsövekben kell összegyűjteni, és a vitellogenin vagy az egyéb vizsgált fehérjék analizálásáig – 20 °C-on kell tárolni.

3B. eljárás: Zebradánió, vérvétel szívpunkcióval

A véralvadás és a fehérjék lebomlásának elkerülése érdekében a mintákat heparint (1 000 egység/ml) és aprotinin proteázinhibitort (2 TIU/ml) tartalmazó foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS) kell gyűjteni. A puffer összetevőjeként heparin, ammóniumsó és liofilizált aprotinin használata ajánlott. A vérvétel céljára rögzített vékony tűvel (pl. Braun Omnikan-F) ellátott fecskendő (1 ml) használata javasolt. A fecskendőt előre meg kell tölteni a pufferrel (körülbelül 100 µl), hogy teljesen feloldja a halakból származó kis vértérfogatokat. A vérmintát szívpunkcióval kell venni. Először a halat MS-222 oldattal (100 mg/l) érzéstelenníteni kell. Megfelelő érzéstelenítéssel kivehetővé válik a zebradánió szívverése. A szív megszúrása közben enyhe nyomást kell kifejteni a fecskendő dugattyújára. A begyűjthető vértérfogat 20–40 mikroliter között van. A szívpunkció után a vérpuffer keveréket a kémcsőbe kell tölteni. A vérplazmát a vérből centrifugálással (20 perc, 5 000 *g*) kell elkülöníteni, és az analízisig – 80 °C-on tárolni.

3C. eljárás Szabványműveleti előírás: Zebradánió, fej/farok homogenizátum készítése

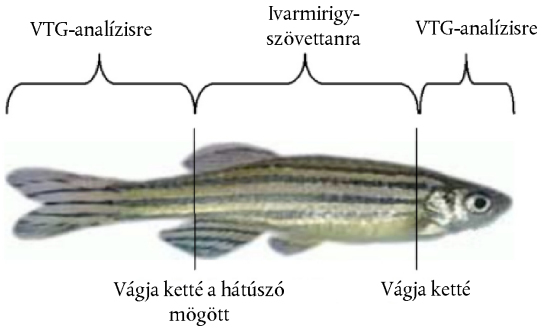
1. A halakat a vizsgálati leírásnak megfelelően érzéstelenníteni kell, majd le kell ölni.

2. A halak fejét és farkát az 1. ábrának megfelelően le kell vágni.

Fontos megjegyzés: *A nem indukált hímek nőstényektől vagy indukált hímektől eredő „vitellogeninszennyeződésének” megelőzése céljából a boncolóeszközöket, valamint a vágódeszkát az egyes halak kezelése között le kell öblíteni és alaposan meg kell tisztítani (pl. 96 %-os etanollal).*

▼M7

1. ábra



3. Az egyes halak fejének és farkának együttesen mért tömegét a legközelebbi mg-ra kell kerekíteni.

4. A mérés után a testrészek megfelelő (pl. 1,5 ml-es Eppendorf-) csövekbe kerülnek, és – 80 °C-on homogenizálódásig kell azokat fagyasztani, vagy jégen két műanyag mozsártörővel közvetlenül homogenizálni. (Más módszerek is használhatók, ha azokat jégen végezik, és homogén tömeget eredményeznek). Fontos megjegyzés: *A csöveket megfelelően meg kell számozni, hogy az adott halból származó fejet és farkat össze lehessen kapcsolni az ivarmirigy szövettani vizsgálatához használt megfelelő törzsdarabbal.*

5. A homogén massza létrejöttét követően a szövet tömegének 4-szeresét kitevő mennyiségű jéghideg homogenizáló puffert ([1]) kell hozzáadni. A mozsártörővel addig kell dolgozni, amíg a keverék homogén nem lesz. Fontos megjegyzés: *Minden halhoz új mozsártörőt kell használni.*

6. A mintákat a **4 °C**-on 50 000 *g*-vel 30 percig zajló centrifugálásig jégre kell tenni.

7. A felülúszóból pipettával 20 µl térfogatú adagokat át kell vinni legalább két csőbe úgy, hogy a pipetta hegyét a felületen lévő zsírréteg alá kell meríteni és a zsír- vagy pelletfrakció nélküli felülúszót óvatosan fel kell szívni.

8. A csöveket felhasználásig – 80 °C hőmérsékleten kell tárolni.

([1]) Homogenizáló puffer:
— (50 mmol Tris-HCl, pH 7,4; 1 % proteázgátló koktél (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteázgátló koktél.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) pl. Bie & Berntsen, Dánia.
— Proteázgátló koktél: Sigmától (emlősszövetekhez). Termékszám P 8340.
MEGJEGYZÉS: A homogenizáló pufferoldatot a készítés napján fel kell használni. Használat közben jégre kell helyezni.

▼M7

7. függelék

DÚSÍTOTT VITELLOGENINMINTÁK ÉS INTER-ASSAY (VIZSGÁLATKÖZI) REFERENCIASTANDARD

Minden olyan napon, amikor VTG-vizsgálatot végeznek, egy inter-assay (vizsgálatközi) referenciastandard felhasználásával készült dúsított mintát is analizálni kell. Az inter-assay referenciastandard készítéséhez használt VTG-nek az elvégzendő vizsgálat céljára készített kalibrációs standardokban használt vitellogenintől eltérő tételből kell származnia.

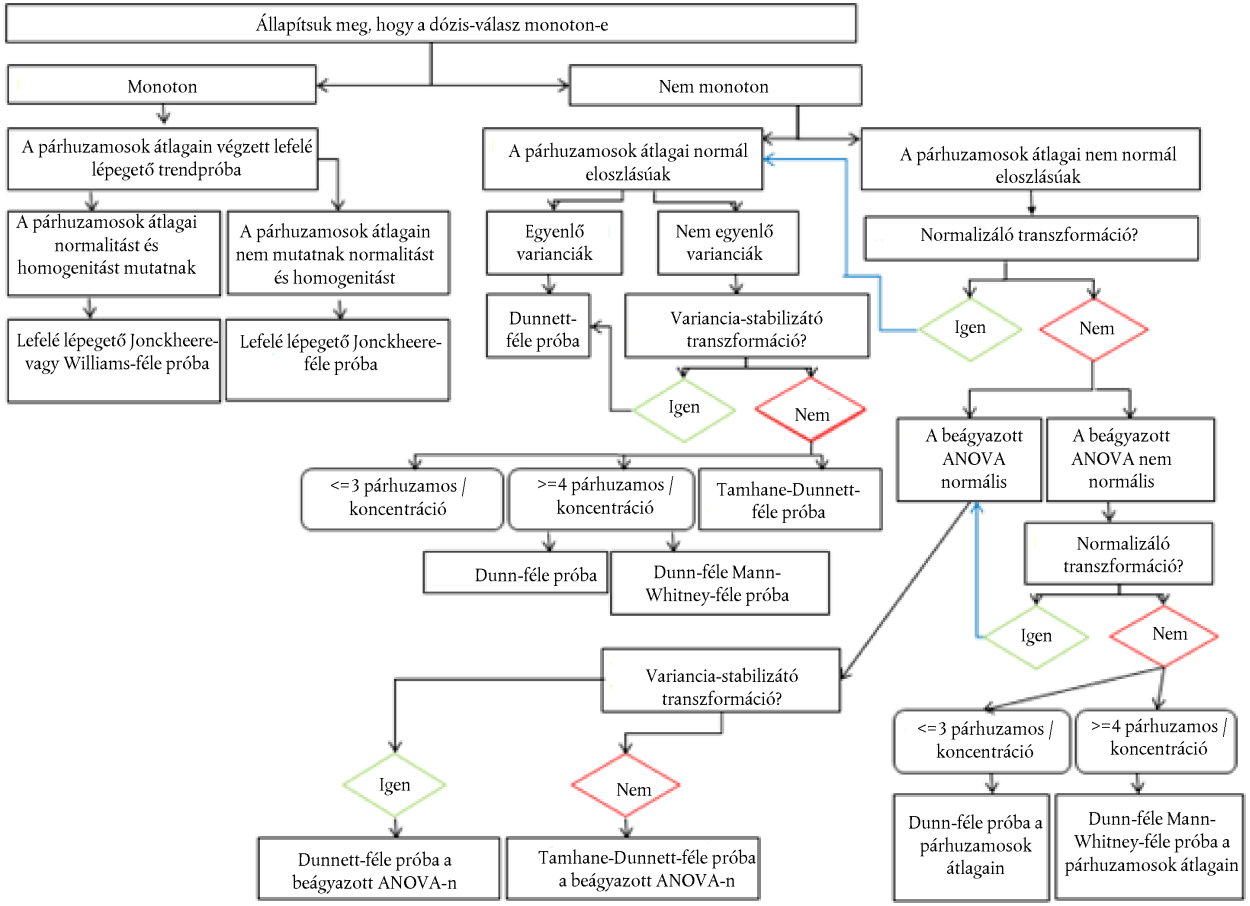
A dúsított minta ismert mennyiségű inter-assay standardnak egy kontrollhím vérplazmájából vett mintához történő hozzáadásával készül. A mintát úgy kell feldúsítani, hogy a VTG koncentrációja elérje a kontrollcsoportban lévő hím halakban várható vitellogeninszint 10–100-szorosát. A kontrollhím vérplazmájából vett dúsítandó minta származhat egyetlen halból vagy lehet több halból származó kompozit minta is.

A kontrollhímből vett vérplazma nem dúsított részmintáját legalább két lyukban analizálni kell. A dúsított mintát is legalább két lyukban kell analizálni. A várható koncentráció meghatározásához a VTG-nek a kontrollhím vérplazmájából vett két nem dúsított mintában mért átlagos mennyiségét hozzá kell adni a dúsított mintákhoz adott VTG számított mennyiségéhez. E várható koncentrációnak a mért koncentrációhoz viszonyított arányát az adott napon elvégzett valamennyi vizsgálat eredményeivel együtt jegyzőkönyvezni kell.

▼M7

8. függelék

DÖNTÉSI FOLYAMATÁBRA A STATISZTIKAI ELEMZÉSI MÓDSZER KIVÁLASZTÁSÁHOZ



02008R0440 — HU — 16.10.2019 — 008.001 — 2495

▼M7

C.49. A HALEMBRIÓK AKUT TOXICITÁSI VIZSGÁLATA

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 236. vizsgálati iránymutatásában (2013) leírt módszerrel. A halembriók akut toxicitási vizsgálatát (FET) zebradániókon (*Danio rerio*) mutatja be. E vizsgálat célja a vegyi anyagok halak embrionális életszakaszaira gyakorolt akut toxicitásának megállapítása. Az FET-vizsgálat a zebradániókon végzett vizsgálatokon és validálási tevékenységeken alapul (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14). Az FET-vizsgálatot sikeresen alkalmazták különböző hatásmechanizmusokat kifejtő, oldhatóságuk, illékonyságuk és víztaszító képességük szempontjából eltérő vegyi anyagok széles skáláján (áttekintés a 15. és 16. pontban).

2. Az e vizsgálati módszerben használt fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

A VIZSGÁLAT ELVE

3. Újonnan megtermékenyített zebradánióikrákat 96 órára kiteszik a vizsgálati vegyi anyagnak. Minden 24 órában legfeljebb négy apikális megfigyelést rögzítenek, az elhullás indikátoraként (6): i. a megtermékenyített peték koagulációja, ii. az őscsigolyák (szomiták) kialakulásának elmaradása; iii. a farokbimbó szikzacskóról való leválásának elmaradása; iv. szívverés hiánya. Az expozíciós időszak végén az akut toxicitást a négy feljegyzett apikális megfigyelés egyikében tapasztalt pozitív eredmény alapján határozzák meg, és kiszámítják az LC_{50}-et.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

4. Az anyagspecifikus tulajdonságokkal kapcsolatos hasznos információk többek között a szerkezeti képlet, a molekulatömeg, a tisztaság, a vízben és a fény hatására tanúsított stabilitás, a pK_a és a K_{ow}, a vízoldékonyság, a gőznyomás, továbbá az azonnali biológiai lebonthatóságra irányuló vizsgálat eredményei (C.4. vizsgálati módszer (17) vagy C.29. (18) vizsgálati módszer). A vízoldékonyságból és a gőznyomásból meghatározható a Henry-állandó, amely megmutatja, hogy előfordulhat-e a vizsgálati vegyi anyag párolgás miatt eltávozása. Olyan megbízható analitikai módszerrel kell rendelkezni a vizsgálati oldatokban lévő anyag számszerűsítésére, amelynek pontossága és érzékelési határa ismert és dokumentált.

5. Ha a vizsgálati módszert keverék vizsgálatára alkalmazzák, annak összetételét lehetőség szerint jellemezni kell, pl. az alkotóelemeinek kémiai azonosításával, azok mennyiségi előfordulásával, továbbá anyagspecifikus tulajdonságaival (lásd a 4. pontot). A vizsgálati módszernek adott keverék szabályozási célú vizsgálatára történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az elfogadható eredményeket biztosít-e a szándékolt szabályozási célra.

6. Az anyagcsere során aktiválható anyagokat érintően bizonyított, hogy a zebradánió embriói rendelkeznek biotranszformációs képességgel (19)(20)(21)(22). Ugyanakkor az embrióállapotú halak anyagcsere-képessége nem mindig hasonló egy növendékéhez vagy felnőtt egyedéhez. Például az allilalkoholt (9), mint metabolikus prekurzort az FET-vizsgálattal nem lehetett kimutatni. Ezért amennyiben arra utaló jelek tapasztalhatók, hogy a metabolitok vagy más releváns transzformációs termékek toxikusabbak lehetnek az anyavegyületnél, javasolt továbbá a vizsgálatot e metabolitokkal/transzformációs termékekkel lefolytatni, és ezeket az eredményeket felhasználni a vizsgálati vegyi anyag toxicitásával kapcsolatos következtetésekhez, vagy pedig egy másik vizsgálatot lefolytatni, amely nagyobb mértékben figyelembe veszi az anyagcserét.

7. A $\geq$ 3kDa molekulatömegű (igen terjedelmes molekulaszerkezetű) anyagok, illetve a kikelést késleltető anyagok esetében, amelyek kizárhatják vagy mérsékelhetik a kikelést követő expozíciót, az embriók várhatóan nem lesznek érzékenyek az anyag korlátozott biológiai hasznosíthatósága miatt, és más toxicitási vizsgálatok megfelelőbbek lehetnek.

▼M7

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

8. A következő feltételeknek kell teljesülniük ahhoz, hogy a vizsgálat eredményei érvényesek legyenek:

a) A begyűjtött peték általános megtermékenyítési aránya ≥ 70 % kell legyen a vizsgált tételben.

b) A vízhőmérsékletet 26 ± 1 °C-on kell tartani a vizsgálati kamrákban a vizsgálat teljes tartama alatt.

c) A negatív (hígítóvizes) kontrollban és adott esetben az oldószeres kontrollban az embriók általános túlélésének ≥ 90 %-nak kell lennie a 96 órás expozíció végéig.

d) A pozitív kontrollnak való expozíció (pl. 4,0 mg/l 3,4-diklór-anilin a zebradánió esetében) eredményeként a 96 órás expozíció végén a mortalitásnak legalább 30 %-nak kell lennie.

e) A negatív (hígítóvizes) kontrollban és adott esetben az oldószeres kontrollban a kikelési aránynak ≥ 80 %-nak kell lennie a 96 órás expozíció végéig.

f) A 96 órás expozíció végén az oldottoxigén-koncentrációnak a negatív kontrollban és a legmagasabb vizsgálati koncentrációnak ≥ 80 %-os telítettségűnek kell lennie.

A MÓDSZER ISMERTETÉSE

9. A javasolt fenntartási és vizsgálati körülményekről a 2. függelék nyújt áttekintést.

Felszerelés

10. A következő berendezésekre van szükség:

a) kémiailag semleges anyagból (pl. üvegből) készült és az ajánlott betelepítési aránynak megfelelő kapacitású tartályok (lásd a tenyészhalak tartására vonatkozó részt a 14. pontban);

b) inverz mikroszkóp és/vagy binokuláris mikroszkóp, amely legalább 80-szoros nagyításra képes. Amennyiben a megfigyelések dokumentálására használt helyiséget nem lehet 26 ± 1 °C-ra szabályozni, szabályozott hőmérsékletű, keresztirányban eltolható tárgyasztal vagy más, a hőmérséklet fenntartását szolgáló módszerek szükségesek;

c) vizsgálati kamrák; pl. standard 24 lyukú lemezek, megközelítőleg 20 mm mélységgel (a vizsgálati kamrákról szóló részt lásd a 11. pontban);

d) öntapadó fólia pl. a 24 lyukú lemezek lefedésére;

e) inkubátor, vagy szabályozott hőmérsékletű légkondicionált helyiség, amely lehetővé teszi a lyukakban (vagy a vizsgálati kamrákban) a 26 ± 1 °C fenntartását.

f) pH-mérő;

g) oxigénmérő,

h) vízkeménység és vezetőképesség meghatározására szolgáló berendezés,

i) ivadékcsapda: üveg, rozsdamentes acél vagy más semleges anyagból készült eszköztálcák; rozsdamentes acélból vagy más semleges anyagból készült (2 ± 0,5 mm szembőségű) drótháló a már lerakott ikrák védelmére; ívási aljzat (növényutánzatok semleges anyagból) (C.48. vizsgálati módszer, 4a. függelék (23));

j) szélesített nyílású pipetták a peték összegyűjtéséhez;

▼M7

k) a különböző vizsgálati koncentrációk és hígítóvíz készítésére használt üvegedények (főzőpohár, mérőlombik, mérőhenger, mérőpipetták), vagy a zebradániópeték összegyűjtésére szolgáló eszközök (pl. főzőpoharak, kristályosító csészék);

l) ha alternatív expozíciós rendszereket, pl. átfolyásos (24) vagy passzív adagoló rendszert (25) használnak a vizsgálat lefolytatásához, ehhez megfelelő eszközök és felszerelések szükségesek.

Vizsgálati kamrák

11. Üveg vagy polisztirol vizsgálati kamrákat kell használni (pl. 24 lyukú lemezeket, lyukanként 2,5–5 ml töltési kapacitással). Ha gyanítható a polisztirolhoz való adszorpció (pl. a nem poláris, kétdimenziós anyagok esetében, amelyek K_{OW} értéke magas) semleges anyagokat (üveget) kell használni az adszorpcióból eredő veszteség mérséklésére (26). A vizsgálati kamrákat véletlenszerűen kell az inkubátorban elhelyezni.

A vízre és a vizsgálatra vonatkozó körülmények

12. A tartásra szolgáló vizet ajánlott hígítani, hogy a felszíni vizek széles skálájára jellemző keménységi szintet érjenek el. A hígítóvizet művízből kell elkészíteni (27). Az eredményül adódó keménységi foknak 100–300 mg/l $CaCO_3$ értékkel kell egyenértékűnek lennie a kalcium-karbonát túlzott kicsapódásának megelőzése érdekében. Más, kellően jellemzett felszíni vagy kútvíz használható. A művizet ionmentesített vízzel történő 1:5 arányú hígítással legalább 30–35 mg/l $CaCO_3$ keménységűre lehet beállítani a tartásra szolgáló, alacsony keménységű víz előállításához. A vizet az oxigéntelítettséghez levegőztetni kell a vizsgálati vegyi anyag hozzáadása előtt. A hőmérsékletet 26 ± 1°C-on kell tartani a lyukakban a teljes vizsgálat során. A pH-értéknek a 6,5–8,5 közötti tartományba kell esnie, és e tartományon belül nem változhat a vizsgálat során 1,5 egységnél nagyobb mértékben. Ha a pH várhatóan nem marad e tartományon belül, akkor a vizsgálat megkezdése előtt a pH-t be kell állítani. A pH-beállítást úgy kell elvégezni, hogy a törzsoldat koncentrációja ne változzon jelentős mértékben, és a vizsgálati vegyi anyag ne lépjen kémiai reakcióba más anyaggal, vagy ne csapódjon ki. A vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó oldatokban hidrogénklorid (HCl) vagy nátrium-hidroxid (NaOH) ajánlott.

Vizsgálati oldatok

13. A kiválasztott koncentrációjú vizsgálati oldatok pl. a törzsoldat hígításával készíthetők el. A törzsoldatot lehetőleg a vizsgálati vegyi anyagnak a hígítóvízbe mechanikai eszközök (pl. keverő és/vagy ultrahang) segítségével történő bekeverésével vagy hozzákeverésével kell elkészíteni. Ha a vizsgálati vegyi anyag nehezen oldható vízben, az OECD nehezen vizsgálható anyagok és keverékek kezelésére vonatkozó 23. iránymutatásában leírt eljárásokat kell követni (28). Az oldószerek használatát kerülni kell, de egyes esetekben szükség lehet oldószer használatára a megfelelő töménységű törzsoldat előállításához. Amennyiben oldószert használnak a törzsoldat elkészítéséhez, az oldószer végső koncentrációja nem lehet több, mint 100 µl/l, és lehetőleg azonosnak kell lennie az összes vizsgálati edényben. Ha oldószert használnak, egy további oldószeres kontrollra lesz szükség.

A tenyészhalak tartása

14. Az ikratermeléshez expozícióval nem érintett vad zebradániók tenyészállományát kell használni, amelyek esetében a megtermékenyítési arány megfelelően dokumentált. A halaknak mentesnek kell lenniük fertőzések és betegségek makroszkopikusan észlelhető tüneteitől, és nem kaphatnak (akut vagy megelőző) gyógyszeres kezelést az ívás előtti két hónapban. A tenyészhalakat akváriumban kell tartani, amelynek ajánlott töltési kapacitása

▼M7

halanként 1 l víz, emellett 12–16 órás, rögzített megvilágítási idő javasolt (29)(30)(31)(32)(33). Az optimális szűrés mértékét be kell állítani; kerülni kell a vizet nagyon felkavaró, túlzott mértékű szűrést. Az etetési körülményeket lásd a 2. függelékben. Kerülni kell a túletetést; a vízminőséget és az akvárium tisztaságát pedig rendszeresen ellenőrizni kell, és szükség esetén az eredeti állapotot helyre kell állítani.

Jártassági vizsgálat

15. Lehetőség szerint évente kétszer referenciaanyagként (a validálási vizsgálatokban használt (1)(2)) 3,4-diklór-anillint kell vizsgálni teljes koncentráció-válasz tartományban, hogy ellenőrizzék az alkalmazott haltörzs érzékenységét. Minden olyan laboratóriumnak, amely a vizsgálatot először alkalmazza, ezt a referenciaanyagot kell használnia. Mielőtt a laboratórium szabályozási célokra adatokat bocsátana rendelkezésre, e vegyi anyag vizsgálatával demonstrálhatja a vizsgálat elvégzésében való jártasságát.

Peteképződés

16. A zebradánió petéi képződhetnek ívási csoportokban (egyedi ívótartályokban) vagy tömeges ívással (a halak tartására szolgáló tartályokban). Az ívási csoport esetében a tenyészcsoportba tartozó hímeket és nőstényeket (pl. 2:1 arányban) ívótartályokba kell helyezni a vizsgálat előtti napon a sötétedés beállta előtt néhány órával. Mivel alkalmanként előfordulhat, hogy a zebradániók ívócsoportjai nem ívnak, legalább három ívótartály párhuzamos használata ajánlott. A genetikai torzulások megelőzése érdekében a petéket legalább három tenyészcsoportból gyűjtik be, vegyesen és véletlenszerűen választva.

17. A peték begyűjtéséhez az ívócsapdákat az ívótartályokba vagy a haltartásra szolgáló tartályokba helyezik a vizsgálat előtti napon a sötétedés beállta előtt, vagy a vizsgálat napján a megvilágítás kezdete előtt. Annak megelőzésére, hogy a felnőtt zebradániók megegyék a petéket, az ívócsapdákat semleges anyagból készült, megfelelő szembőségű (megközelítőleg 2 ±0,5 mm) dróthálóval fedik le. Ha szükségesnek ítélik, semleges anyagból (pl. műanyagból vagy üvegből) készült műnövényeket lehet a hálóra rögzíteni az ívás ösztönzése érdekében (3)(4)(5)(23)(35). Vízlepergető műanyagokat kell használni, amelyek nem mosódnak bele a vízbe (pl. ftaláltok). A párzás, ívás és megtermékenyítés a megvilágítás kezdetétől számítva 30 percen belül következik be, és az ívócsapdákat a begyűjtött petékkel óvatosan kell eltávolítani. Ajánlott a petéket a csapdákból való begyűjtést követően művízzel lemosni.

Peték differenciálódása

18. 26°C-on mintegy 15 perc múlva végbemegy a megtermékenyített peték első osztódása, és az azt követő egyidejű osztódások során 4, 8, 16 és 32 szelvény (blastomera) alakul ki (lásd a 3. függeléket) (35). Ezekben a szakaszokban a megtermékenyített peték egyértelműen azonosíthatók a blastula kialakulásával.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

Az expozíció körülményei

19. Koncentrációnként húsz embriót (lyukanként egyet) tesznek ki a vizsgálati vegyi anyagnak. Az expozíciót úgy kell kialakítani, hogy a névleges vegyianyag-koncentráció ±20 %-án maradjon fenn az egész vizsgálat során. Ha ez statikus rendszerben nem lehetséges, megvalósítható félstatikus oldatcserés intervallumot kell alkalmazni (pl. 24 óránkénti cserét). Ezekben az esetekben az expozíciós koncentrációkat legalább a legmagasabb és legalacsonyabb vizsgálati koncentrációnál ellenőrizni kell az egyes expozíciós intervallumok kezdetekor és végén (lásd a 36. pontot). Ha a névleges vegyianyag-koncentráció ±20 %-ának megfelelő expozíciós koncentráció nem tartható fenn, minden koncentrációt ellenőrizni kell az egyes expozíciós intervallumok kezdetekor és végén (lásd a 36. pontot). Az oldatcserénél gondoskodni kell arról, hogy az embriókat legalább csekély mennyiségben fedje a régi

▼M7

vizsgálati oldat a kiszáradás elkerülése érdekében. A vizsgálati tervet adott anyagok vizsgálati követelményeinek teljesítése érdekében ki lehet igazítani (pl. átfolyásos (24) vagy passzív adagolási rendszer (25) alkalmazható a könnyen lebomló vagy nagymértékben adszorbeáló anyagok (29) esetében, vagy más rendszer az illékony anyagok esetében (36)(37)). Minden esetben gondosan ügyelni kell arra, hogy az embriókat a lehető legkevesebb stresszhatás érje. A vizsgálati kamrákat a vizsgálat kezdete előtt legalább 24 óráig kondicionálni kell a vizsgálati oldatokkal. A vizsgálati körülményeket a 2. függelék foglalja össze.

Vizsgálati koncentrációk

20. A vizsgálati vegyi anyagból általában ötféle, egy 2,2 értékű konstans tényezőt meg nem haladó osztások szerint beállított koncentráció használata szükséges a statisztikai követelményeknek való megfelelés érdekében. Ötnél kevesebb vizsgálati koncentráció használatát indokolni kell. A legmagasabb vizsgált koncentráció eredményezzen lehetőleg 100 %-os elhullást, a legalacsonyabb vizsgált koncentráció pedig lehetőleg ne okozzon megfigyelhető hatást, amint azt a 28. pont meghatározza. A meghatározó vizsgálatot megelőző dózisbehatároló vizsgálat lehetővé teszi a megfelelő koncentrációtartomány megválasztását. A dózisbehatároláshoz szokásosan koncentrációnként tíz embriót használnak. A következő utasítások a 24 lyukú lemezen végrehajtott vizsgálatra vonatkoznak. Ha eltérő vizsgálati kamrákat (pl. kisebb Petri-csészéket) használnak, vagy több koncentrációt vizsgálnak, ezeket az utasításokat ennek megfelelően kell kiigazítani.

21. A koncentrációk 24 lyukú lemezek közötti elosztására vonatkozó részleteket és vizuális utasításokat a 27. pont, valamint a 4. függelék 1. ábrája tartalmazza.

Kontrollcsoportok

22. Hígítóvizes kontrollokat kell képezni mind negatív kontrollként, mind egy lemez belső kontrolljaként. Ha a lemez belső kontrolljában több mint egy elhullott embrió figyelhető meg, a lemezt ki kell venni a vizsgálatból, és így csökken az LC_{50} származtatásához használt koncentrációk száma. Ha egy teljes lemezt kivonnak, a megfigyelt hatások értékelése vagy észlelése nehézkesebbé válik, főleg akkor, ha a kivett lemez az oldószeres kontrollt tartalmazó lemez, vagy olyan lemez, amelyben kezelt embriók is érintettek. Az első esetben a vizsgálatot meg kell ismételni. A második esetben egy teljes kezelt csoportnak a belső kontroll mortalitása miatti kiesése korlátozhatja a hatások értékelését és az LC_{50} értékek meghatározását.

23. A vizsgálatra használt valamennyi peteadagon 3,4-diklór-anilin 4 mg/l rögzített koncentrációjával pozitív kontrollt kell beállítani.

24. Amennyiben oldószert használnak, egy további, 20 embrióból álló csoportot tesznek ki az oldatnak egy különálló 24 lyukú lemezen, amely így az oldószeres kontroll lesz. A vizsgálat akkor ítélhető elfogadhatónak, ha az oldószer bizonyítottan nem gyakorol jelentős hatást a kikeléshez szükséges időre és a túlélésre, illetve nem idéz elő semmilyen más káros hatást az embrióra nézve (vö. 8c. pont).

Az expozíció kezdete és a vizsgálat időtartama

25. A vizsgálat a peték megtermékenyítését követően a lehető leghamarabb elkezdődik, és 96 órás expozíciót követően ér véget. Az embriókat a csírakorong osztódása előtt, de legkésőbb a 16 sejtes stádium előtt a vizsgálati oldatokba kell helyezni. Annak érdekében, hogy az expozíció minimális késedelemmel kezdődjön, a megtermékenyítést követően legfeljebb 90 perccel a kezelt csoportonként szükséges számú pete legalább kétszeresét kell véletlenszerűen kiválasztani és a megfelelő koncentrációjú oldatokba, illetve kontrollokba helyezni (pl. 100 ml-es kristályosító csészébe; a petéket az oldatnak teljesen el kell lepnie).

26. Az életképes megtermékenyített petéket el kell különíteni a meg nem termékenyült petéktől, és azokat 24 órás előzetes kondicionálásnak alávetett 24

▼M7

lyukú lemezekre kell áthelyezni, továbbá tartályonként 2 ml frissen elkészített vizsgálati oldattal kell feltölteni a megtermékenyítést követő 180 percen belül. Sztereomikroszkóp segítségével (ami lehetőség szerint ≥30-szoros nagyítást biztosít) kiválasztásra kerülnek az osztódó és az osztódás során nyilvánvaló rendellenességet (pl. aszimmetria, hólyagképződés) vagy a chorion sérülését nem mutató megtermékenyített peték. A peték begyűjtése és elkülönítése tekintetében lásd a 3. függelék 1. és 3. ábráját, illetve a 4. függelék 2. ábráját.

A peték elosztása a 24 lyukú lemezek között

27. A petéket a lyukas lemezek között a következő számban kell elosztani (lásd még a 4. függelék 1. ábráját).

— 20 pete egy lemezen valamennyi vizsgálati koncentráció esetében;

— 20 pete oldószeres kontrollként egy lemezen (ha szükséges);

— 20 pete pozitív kontrollként egy lemezen;

— 4 pete hígítóvizben, mint a lemez belső kontrollja a fenti lemezek mindegyikében;

— 24 pete hígítóvízben negatív kontrollként egy lemezen.

Megfigyelések

28. Az egyes vizsgált embriókon végzett apikális megfigyelések a következőkre terjednek ki: az embriók koagulációja, az őscsigolyák (szomiták) kialakulásának elmaradása; a farok leválásának elmaradása; a szívverés hiánya (1. táblázat). Ezeket a megfigyeléseket az elhullás meghatározására használják. E megfigyelések bármelyikének pozitív eredménye azt jelenti, hogy a zebradánió embriója elpusztult. Emellett rögzíteni kell a kikelést a kezelt és a kontrollcsoportban, naponta, a 48. órát követően. A megfigyeléseket a vizsgálat végéig 24 óránként rögzíteni kell.

1. táblázat

Az akut toxicitás apikális megfigyelései zebradániók embrióiban a megtermékenyítést követő 24–96 órában.

	Expozíciós időtartam			
	24 óra	48 óra	72 óra	96 óra
Koagulált embriók	+	+	+	+
Őscsigolya kialakulásának elmaradása	+	+	+	+
A farok leválásának elmaradása	+	+	+	+
Szívverés hiánya		+	+	+

29. *Az embrió koagulációja:* A koagulált embriók tejfehérek, mikroszkóp alatt sötétnek tűnnek (lásd az 5. függelék 1. ábráját). A koagulált embriók számát 24, 48, 72 és 96 óra elteltével kell meghatározni.

30. *Őscsigolya kialakulásának elmaradása:* A rendesen fejlődő zebradánióembrióban 26 ± 1 °C-on mintegy 20 őscsigolya alakul ki 24 óra elteltével (lásd az 5. függelék 2. ábráját). A rendesen fejlődő embrió spontán mozgást mutat (kétoldali összehúzódások) A spontán mozgás az őscsigolyák kialakulását jelzi. Az őscsigolyák hiányát fel kell jegyezni 24, 48, 72 és 96 óra elteltével. Ha 24 óra elteltével nem alakulnak ki őscsigolyák, az esetleg a fejlődés általános késedelmének következménye. Legkésőbb 48 óra elteltével az őscsigolyáknak ki kell alakulniuk. Ennek elmaradása esetén az embrió elhullottnak tekinthető.

31. *A farok leválásának elmaradása:* A rendesen fejlődő zebradánióembrió esetében a farok szikzacskóról való leválása (lásd az 5. függelék 3. ábráját)

▼M7

az embriótest megnyúlását követően figyelhető meg. A farok leválásának elmaradását 24, 48, 72 és 96 óra elteltével kell rögzíteni.

32. *Szívverés hiánya:* A rendesen fejlődő zebradánióembrióban 26 ± 1 °C-on a szívverés 48 óra elteltével látható (lásd az 5. függelék 4. ábráját). Különös gondot kell fordítani e végpont rögzítésére, mivel a szabálytalan (akadozó) szívverést *nem* szabad elhullásként rögzíteni. Emellett az aorta abdominalisban való keringés nélküli látható szívverés szintén nem tekinthető elhullásnak. E végpont dokumentálásához a szívverést nem mutató embriókat minimum 80-szoros nagyítás alatt, legalább egy percig meg kell figyelni. A szívverés hiányát 48, 72 és 96 óra elteltével kell rögzíteni.

33. Valamennyi kezelt és kontrollcsoport esetén a kikelési arányokat 48 órát követően kell rögzíteni, és fel kell tüntetni a jelentésben. Jóllehet a kikelés nem az LC_{50} számításához használt végpont, a kikelés biztosítja az embrió expozícióját a chorion potenciális védőfunkciója nélkül, és ezáltal segíthet az adatok kiértékelésében.

34. A zebradánióembriók rendes (35) és rendellenes fejlődésére vonatkozó példákat a 3. és az 5. függelék mutatja be.

Analitikai mérések

35. A vizsgálat kezdetekor és a végén a kontroll(ok)ban és a vizsgálati vegyi anyag legmagasabb koncentrációjában mérni kell a pH-értéket, a teljes keménységet és a vezetőképességet. Félstatikus oldatcserés rendszerekben a pH-t a vízcsere előtt és után kell mérni. Az oldottoxigén-koncentrációt a vizsgálat végén kell mérni a negatív kontrollokban és az életképes embriót tartalmazó legmagasabb vizsgálati koncentrációban, ahol annak összhangban kell lennie a vizsgálat érvényességi kritériumaival (lásd a 8f. pontot). Ha aggályos, hogy a hőmérséklet eltérő a 24 lyukú lemezek között, a hőmérsékletet három véletlenszerűen kiválasztott edényben mérni kell. A hőmérsékletet lehetőség szerint folyamatosan rögzíteni kell a vizsgálat során, de legalább naponta.

36. Statikus rendszerben a vizsgálati vegyi anyag koncentrációját legalább a legmagasabb és legalacsonyabb vizsgálati koncentrációnál, de lehetőség szerint minden kezelt csoportban mérni kell a vizsgálat kezdetekor és végén. A félstatikus (oldatcserés) vizsgálatok esetében, ahol a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja várhatóan a névleges értékek ± 20 %-os tartományán belül marad, minimális intézkedésként javasolt a legmagasabb és a legalacsonyabb vizsgálati koncentrációk elemzése a frissen elkészített közegben és közvetlenül az oldatcserét megelőzően. Amennyiben a vizsgálati vegyi anyag koncentrációértékei várhatóan nem maradnak a névleges értékek ± 20 %-os tartományán belül, az összes kísérleti koncentrációt a frissen elkészített közegben és közvetlenül az oldatcserét megelőzően elemezni kell. Ha az analízishez nem elegendő a térfogat, hasznos lehet a vizsgálati oldatok egyesítése vagy ugyanolyan anyagból készült és a 24 lyukú lemezekhez hasonló térfogat/felület aránnyal rendelkező pótkamrák használata. Határozottan javasolt, hogy az eredmények a mért koncentrációkon alapuljanak. Ha a koncentrációk nem maradnak a névleges koncentráció 80–120 %-os tartományán belül, a hatásos koncentrációkat a mért koncentrációk mértani közepéhez viszonyítva kell kifejezni; a részletek tekintetében lásd az OECD nehezen vizsgálható anyagok és keverékek akut toxicitási vizsgálatáról szóló iránymutatásának 5. fejezetét (28)

HATÁRÉRTÉK-VIZSGÁLAT

37. Az e vizsgálati módszerben leírt eljárások segítségével a vizsgálati vegyi anyaggal 100 mg/l mértéken vagy a vizsgálati közegben való oldhatósági határig (amelyik alacsonyabb) határérték-vizsgálat hajtható végre annak bizonyítására, hogy az LC_{50} nagyobb, mint e koncentráció. A határérték-vizsgálatot a kezelt csoportban, a pozitív kontrollban és szükség esetén az oldószeres kontrollban 20 embrióval, a negatív kontrollban pedig 24 embrióval

▼M7

kell végrehajtani. Ha az elhullás százalékos aránya a vizsgált koncentráció mellett 10 %-kal meghaladja a negatív kontrollban (vagy oldószeres kontrollban) tapasztalható mortalitást, teljes vizsgálatot kell végezni. Minden megfigyelt hatást rögzíteni kell. Ha a mortalitás 10 %-nál nagyobb mértékű a negatív kontrollban (vagy az oldószeres kontrollban), a vizsgálat érvénytelen, és azt meg kell ismételni.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Eredmények feldolgozása

38. Ebben a vizsgálatban az egyedi lyukakat független párhuzamosoknak kell tekinteni a statisztikai analízis szempontjából. A vizsgálati koncentrációk függvényében kell ábrázolni azon embriók százalékos arányát, amelyek esetében legalább egy apikális megfigyelés 48 órát és/vagy 96 órát követően pozitív. A görbe meredekségének, az LC_{50} értékeknek és a konfidenciahatároknak (95 %) a számításához megfelelő statisztikai módszereket kell alkalmazni (38), és az OECD „Aktuális megközelítések az ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató” című dokumentumaát (39) kell tanulmányozni.

Vizsgálati jegyzőkönyv

39. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosító adatok, például IUPAC- vagy CAS-név, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonossága stb. (ideértve adott esetben a szervesszén-tartalmat).

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonossága (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai jellemzik.

Vizsgálati szervezetek:

— tudományos név, törzs, forrás és a megtermékenyített peték begyűjtésének módja, valamint a későbbi kezelés.

Vizsgálati körülmények:

— alkalmazott vizsgálati eljárás (pl. félstatikus oldatcserés);

— megvilágítási időszak;

— vizsgálati terv (pl. a vizsgálati kamrák száma, a kontrollok típusa);

— vízminőségi jellemzők a halak tartására szolgáló edényekben (pl. pH-érték, keménység, hőmérséklet, vezetőképesség és oldott oxigén);

— a vizsgálati oldatok oldottoxigén-koncentrációja, pH-értéke, teljes keménysége, hőmérséklete és vezetőképessége a vizsgálat kezdetén és 96 óra elteltével;

— a törzsoldatok és vizsgálati oldatok előállításának módszere és az oldatcsere gyakorisága;

▼M7

— az oldószer alkalmazásának indoklása, továbbá kiválasztásának indoklása, ha nem víz;

— a névleges vizsgálati koncentrációk és a vizsgálati edényekben lévő vizsgálati vegyi anyag koncentrációinak meghatározására végzett valamennyi analízis eredménye; a módszer visszanyerési hatékonyságáról és a meghatározási határról (LoQ) is beszámolva;

— annak igazolása, hogy a kontrollok teljesítették a vizsgálat általános túlélésre vonatkozó érvényességi kritériumait;

— a peték megtermékenyítésének aránya;

— kikelési arány a kezelt és a kontrollcsoportban.

Eredmények:

— az a legmagasabb koncentráció, amely még nem okoz pusztulást a vizsgálat során;

— az a legalacsonyabb koncentráció, amely 100 %-os pusztulást okoz a vizsgálat során;

— az egyes koncentrációk által előidézett összes elhullás a javasolt megfigyelési időpontokban;

— az LC_{50} értékek 96 óránál (és opcionálisan 48 óránál) a mortalitás tekintetében, 95 %-os konfidenciahatár mellett, ha lehetséges;

— a koncentráció/mortalitás görbe grafikus ábrázolása a vizsgálat végén;

— mortalitás a kontrollokban (negatív kontrollok, lemezek belső kontrolljai, továbbá pozitív kontroll és bármely alkalmazott oldószeres kontroll);

— a négy apikális megfigyelés mindegyikének eredményével kapcsolatos adatok;

— a morfológiai és fiziológiai rendellenességek váratlan előfordulása és leírása, ha vannak ilyenek (lásd az 5. függelék 2. ábrájánál megadott példákat);

— a vizsgálat során bekövetkezett váratlan események, amelyek befolyásolhatták az eredményeket;

— statisztikai analízis és adatkezelés (probit analízis, logisztikai regressziós modell, és az LC_{50} mértani átlaga);

— a (transzformált) koncentráció-válasz görbe meredeksége és regressziójának konfidenciahatárai.

Az alkalmazott vizsgálati módszerektől való bármely eltérés és a megfelelő indokolások.

Eredmények kifejtése és kiértékelése.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, 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. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196-209

(17) Chapter C.4 of this Annex: Ready Biodegradability.

(18) Chapter C.29 of this Annex: Ready Biodegradability, CO_2 in sealed vessels.

(19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.

▼M7

(20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133-141.

(21) Incardona, J.P, Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242-249.

(22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.

(23) E melléklet C.48. fejezete: Halak rövid távú reprodukciós vizsgálata. Lásd a 4a. függeléket.

(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. Elérhető az alábbi címen: [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) Európai Bizottság (2007): A Bizottság 2007. június 18-i 2007/526/EK ajánlása a kísérleti és egyéb tudományos célokra használt állatok elhelyezésére és gondozására vonatkozó iránymutatásról (az értesítés a C(2007) 2525. számú dokumentummal történt) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:HU:PDF]

(33) Európai Unió (2010): Az Európai Parlament és a Tanács 2010. szeptember 22-i 2010/63/EU irányelve a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről. (HL L 276., 2010.10.20., 33. o.)

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:HU: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) Chapter C.2 of this Annex: Daphnia sp., Acute Immobilistaion Test.

(37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978

(38) ISO (2006) International Standard. Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Elérhető az alábbi címen: [http://www.iso.org].

(39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.

(40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper „Fish embryo toxicity assays". UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.

▼M7

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Apikális végpont: populációszintű hatás előidézése.

Blastula: az animalis pólus körüli sejtképződés, amely a szik egy részét is lefedi.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Epibólia: elsődlegesen epidermalis sejtek erőteljes elterjedése az embrió gastrula állapotában, és a háti szakaszról a hasi szakaszra vándorlása, amelynek eredményeként az entrodermális sejtrétegek betüremkedéshez hasonló folyamattal internalizálódnak és az embrió körülöleli a szikanyagot.

Átfolyásos vizsgálat: az expozíció során a vizsgálati oldat vizsgálati rendszeren történő folyamatos áramlása mellett folytatott vizsgálat.

Lemez belső kontrollja: olyan belső kontroll, amelyben a 24 lyukú lemezen 4 lyukat hígítóvízzel töltenek meg, hogy azonosítsák a lemezek gyártó általi vagy az eljárás során a kutató általi lehetséges szennyezését, illetve a lemezből eredő azon hatásokat, amelyek esetleg befolyásolhatják a vizsgálat eredményét (pl. hőmérséklet gradiens).

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Elméleti és Alkalmazott Kémia Nemzetközi Uniója).

A halak tartására szolgáló víz: az a víz, amelyben a felnőtt halakat tartják.

Medián letális koncentráció (LC_{50}): a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a becslések szerint a vizsgálat időtartama alatt a vizsgálati szervezetek 50 %-ára nézve halálos.

Félstatikus oldatcserés vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynél rendszeresen, meghatározott időszakonként (pl. 24 óránként) ki kell cserélni a vizsgálati oldatokat.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (molekulák egyszerűsített egy sorban történő beviteli rendszere).

Szomita: a gerinces embriók fejlődése során az őscsigolyák (szomiták) a mezoderma oldalirányú, a velőcső körüli rendeződései, amelyekből adott estben kifejlődik a kötőszövet (dermatoma), a vázizomzat (miotoma) és a csigolyák (szklerotoma).

Statikus vizsgálat: olyan vizsgálat, amelyben az oldatok mindvégig változatlanok maradnak a vizsgálat során.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB-k: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

▼M7

2. függelék

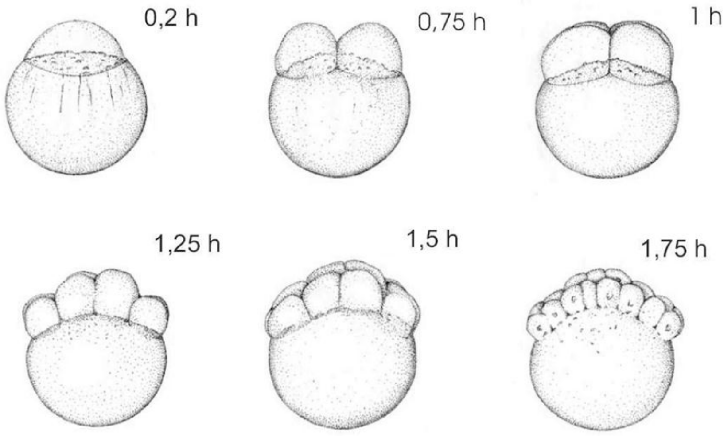
A ZEBRADÁNIÓEMBRIÓVAL FOLYTATOTT AKUT TOXICITÁSI VIZSGÁLATOKRA VONATKOZÓ TARTÁSI, TENYÉSZTÉSI ÉS TIPIKUS KÖRÜLMÉNYEK

Zebradánió (*Danio rerio*)		
Az állatfaj eredete		India, Burma, Malakka, Szumátra
Ivari kétalakúság		Nőstények: kitüremkedő has, ha abban ikrák vannak Hímek: vékonyabbak, a kék hosszanti csíkok között narancssszínű árnyalattal (különösen az anális úszónál szembetűnő)
Etetési rend		Száraz, pelyhesített haleledel (a hal tömegének legfeljebb 3 %-a/nap mennyiségben), napi 3–5 alkalommal; emellett megfelelő méretű és nem szennyezett forrásból származó nauplius sórák (*Artemia* sp. *nauplii*) és/vagy kis vízibolha. Az élő táplálék a környezetgazdagítás forrása, ezért lehetőség szerint élő tápot kell adni. Az optimális vízminőség garantálása érdekében a táplálékfelesleget és az ürüléket az etetést követő körülbelül egy órával el kell távolítani.
A felnőtt halak közelítő tömege		Nőstények: 0,65 ±0,13 g Hímek: 0,5 ±0,1 g
Az ikrás nőstények tartása	Megvilágítás	(Széles spektrumú) fluoreszkáló izzók 10–20 $\mu E/m^2/s$, 540–1 080 lux, vagy 50–100 ft-c (környezeti laboratóriumi szintek); 12–16 óra megvilágítási időszak
	Vízhőmérséklet	26 ± 1 °C
	Vízminőség	O_2 ≥80 % telítettség, keménység: pl. ~30–300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤48 mg/l, NH_4^+ és NO_2^-: <0,001 mg/l, maradék klór <10 µg/l, összes szerves klór <25 ng/l, pH = 6,5–8,5
	A vízminőségre vonatkozó további követelmények	Szemcsés anyag <20 mg/l, teljes szervesszén-tartalom <2 mg/l, összes szervesfoszfor-tartalmú növényvédő szer <50 ng/l, összes szervesklór-tartalmú növényvédő szer plusz poliklórozott bifenilek <50 ng/l
	A tartásra szolgáló tartály mérete	pl. 180 l, 1 hal/l
	Víztisztítás	Állandó (szénszűrős); egyéb lehetőségek többek között a félstatikus, vízcserén alapuló tartással vagy a folyamatos vízcserét biztosító átfolyásos rendszerrel való kombináció
	Ajánlott hím/nőstény arány a tenyésztés szempontjából	2:1 (vagy tömeges ívás)
Ívótartályok		pl. 4 l-es tartály acélrács fenékkel és az ívás ösztönzésére műnövénnyel; külső melegítő szőnyegek, vagy tömeges ívás a tartásra szolgáló tartályban
A peték felépítése és megjelenése		Stabil chorion (azaz nagymértékben átlátszó, nem ragadós, ~ 0,8–1,5 mm átmérőjű)
Ívási arány		Egy ivarérett nőstény naponta legalább 50–80 petét rak le. A törzstől függően az ívási arány jóval magasabb lehet. A megtermékenyítési aránynak ≥70 %-nak kell lennie. Az először ívó halak esetében a peték megtermékenyítési aránya az első néhány íváskor alacsonyabb lehet.
A vizsgálat típusa		Statikus, félstatikus oldatcserés vagy átfolyásos, 26 ± 1 °C, 24 órán át kondicionált vizsgálati kamrák (pl. 24 lyukú lemezek, 2,5–5 ml üregenként)

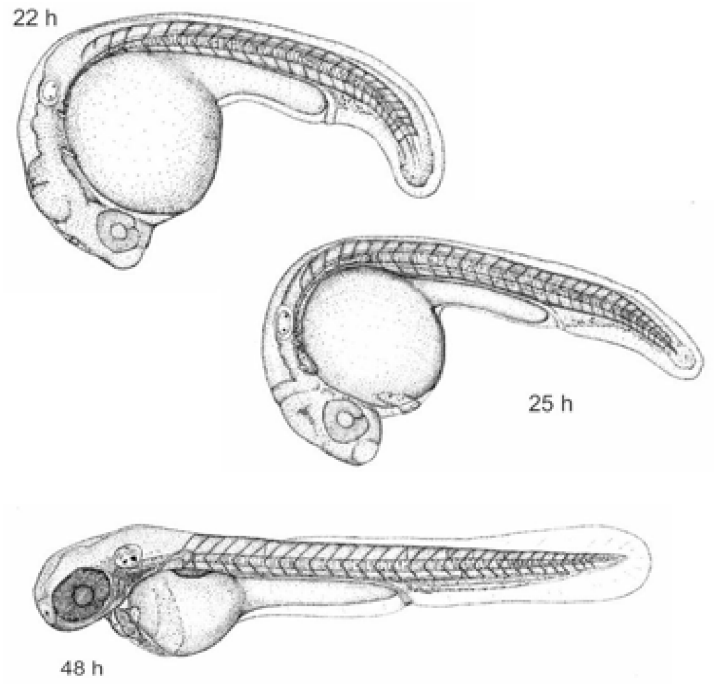
▼M7

3. függelék

A ZEBRADÁNIÓK RENDES FEJLŐDÉSE 26 °C-ON

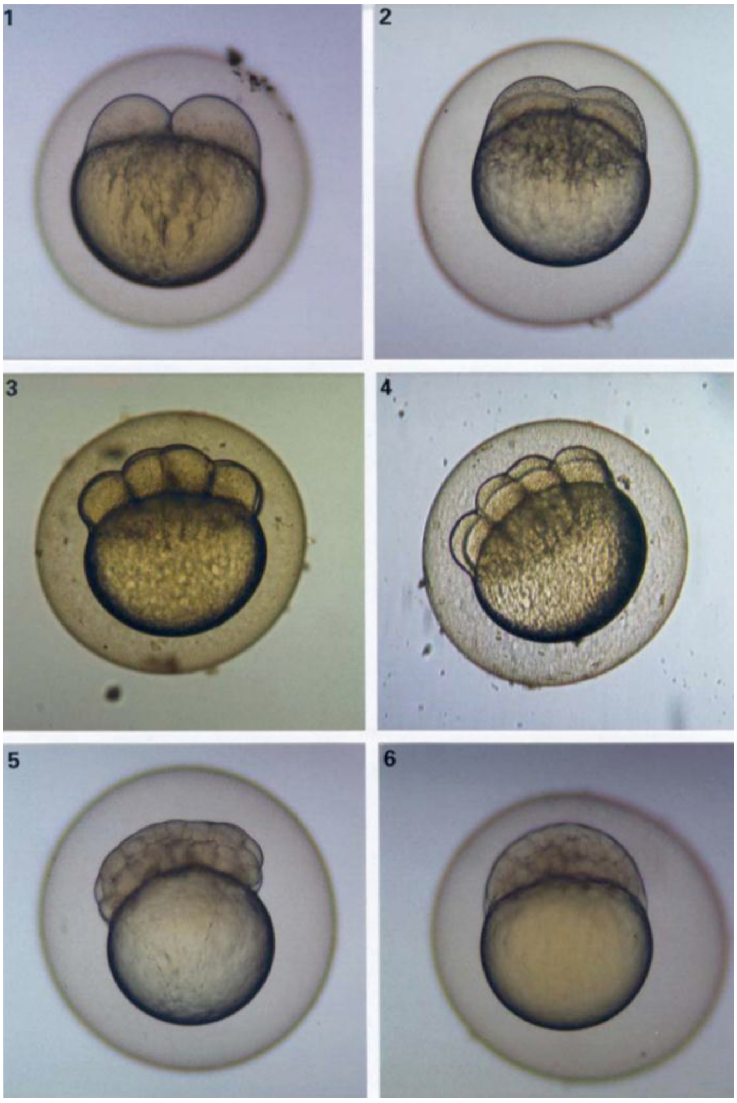


1. ábra: A zebradánió (Danio rerio) korai fejlődésének kiválasztott szakaszai: A megtermékenyítést követő 0,2 – 1,75 óra (forrás: Kimmel *et al*., 1995 (35)). A szokásos fejlődés időrendjét lehet alapul venni a megtermékenyülés és a peték életképességének megállapításához (lásd a 26. pontot: A megtermékenyített peték kiválasztása).



2. ábra: A zebradánió (Danio rerio) késői fejlődésének kiválasztott szakaszai (chorion nélküli embriók a láthatóság optimalizálása érdekében): A megtermékenyítést követő 22 – 48 óra (forrás: Kimmel *et al*., 1995 (35)).

▼M7



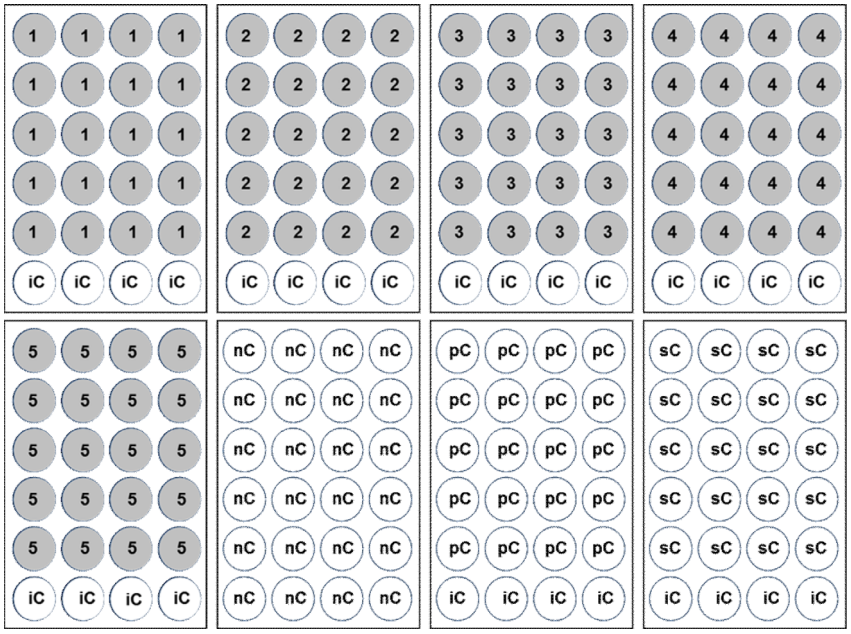
3. ábra: A zebradánió (Danio rerio) embrióinak rendes fejlődése: (1) 0,75 óra, kétsejtes szakasz; (2) 1 óra, négysejtes szakasz; (3) 1,2 óra, nyolcsejtes szakasz (4) 1,5 óra, 16 sejtes szakasz; (5) 4,7 óra, az epibólia kezdete; (6) 5,3 óra, megközelítőleg 50 %-os epibólia (forrás: Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

▼M7

4. függelék

1. ábra

A 24 lyukú lemez kialakítása



1–5 = öt vizsgálati koncentráció / vegyi anyag;

nC = negatív kontroll (hígítóvíz);

iC = lemez belső kontrollja (hígítóvíz);

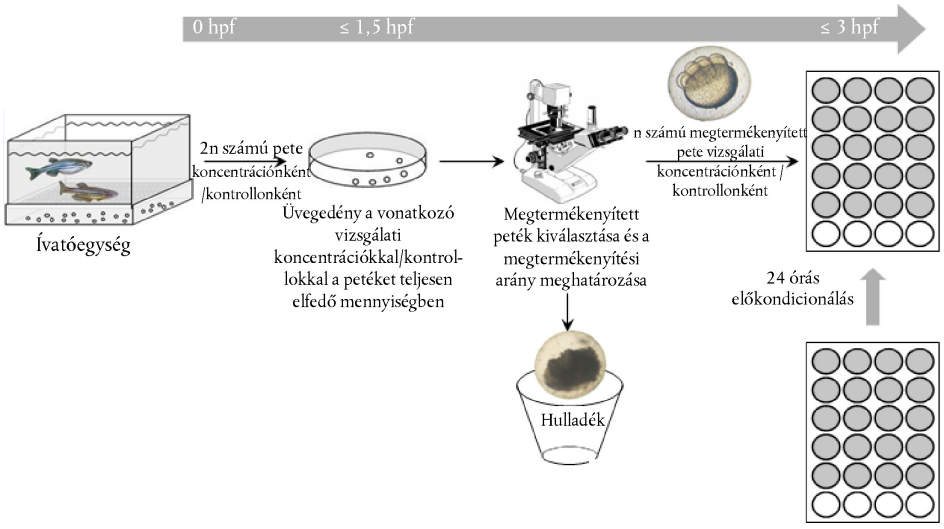
pC = pozitív kontroll (3,4-DCA 4mg/l);

sC = oldószeres kontroll

▼M7

2. ábra

A zebradánióembrióval folytatott akut toxicitási vizsgálat folyamatábrája (balról jobbra): peték termelődése, a peték begyűjtése, előzetes expozíció a megtermékenyítés után azonnal, üvegedényekben; a megtermékenyített peték kiválasztása inverz mikroszkóppal vagy binokuláris mikroszkóppal, továbbá a megtermékenyített peték megfelelő vizsgálati koncentrációkat/kontrolloldatokat tartalmazó 24 lyukú lemezekbe történő kiosztása, n=a vizsgálati koncentrációnként/kontrollonként szükséges peték száma (itt 20), hpf = a megtermékenyítést követően eltelt órák.



▼M7

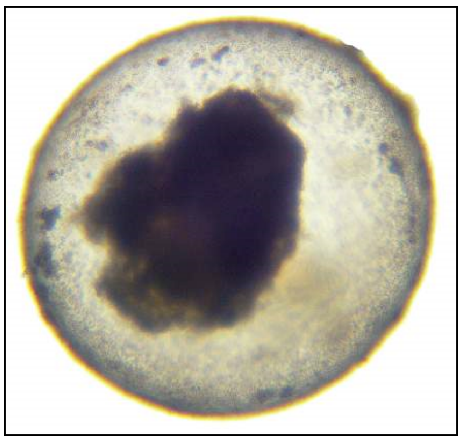
5. függelék

A ZEBRADÁNIÓEMBRIÓVAL FOLYTATOTT AKUT TOXICITÁSI VIZSGÁLAT LETÁLIS VÉGPONTJAINAK ATLASZA

A következő apikus végpontok akut toxicitásra, és ennélfogva az embriók elhullására utalnak: *az embrió koagulációja, a farok elválásának elmaradása, az őscsigolyák képződésének elmaradása és a szívverés hiánya*. E végpontok illusztrálására az alábbi mikrofelvételek szolgálnak:

1. ábra

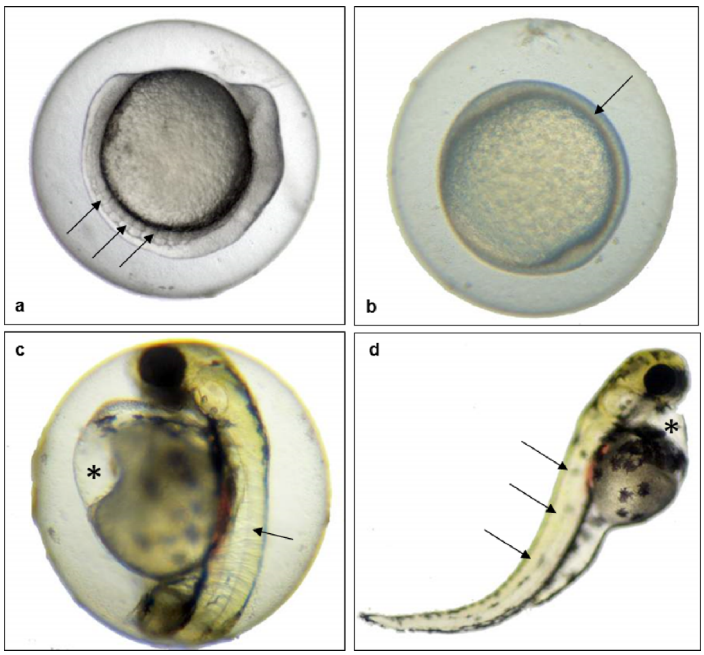
Az embrió koagulációja



Erős fényű helyszíni megvilágítás mellett a koagulált zebradánióembriók változatos átlátszatlan zárványokat mutatnak.

2. ábra

Őscsigolya kialakulásának elmaradása

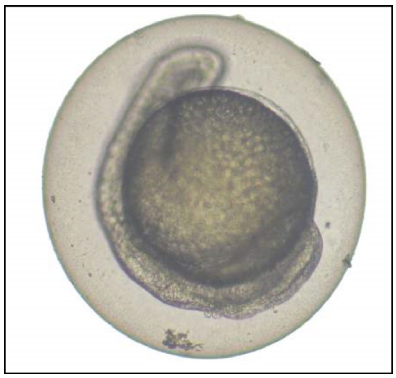


▼M7

Jóllehet a fejlődése megközelítőleg 10 órával elmaradott, a 24 órás zebradánió-embrió az a) ábrán jól kifejlett szomitákat mutat (→), míg a b) ábrán látható embriónál nem tapasztalhatók szomitaképződésre utaló jelek (→). Jóllehet a szikzacskó kifejezetten ödémás (*), a 48 órás zebradánióembrió a c) ábrán jól kifejlett szomitákat mutat (→), míg a d) ábrán látható 96 órás embriónál nem tapasztalhatók szomitaképződésre utaló jelek (→). Meg kell jegyezni, hogy a d) ábrán szereplő embrió esetében gerincferdülés (scoliosis) és perikardiális ödéma (*) látható.

3. ábra

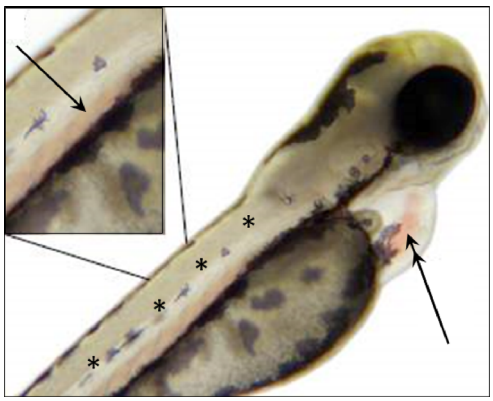
A farokbimbó elválásának elmaradása oldalnézetből



(a: →; 96 órás zebradánióembrió). Megfigyelhető a szemhólyagok hiánya is (*).

4. ábra

A szívverés hiányát



A szívverés hiányát – jellegéből adódóan – nehéz mikrofelvételen megjeleníteni. A szívverés hiányát a szív összehúzódásának elmaradása jelöli (kettős nyíl). A vérsejtek mozdulatlansága pl. az aorta abdominalisban (→ a kis képen) nem a szívverés hiányára utal. Megjegyzendő a szomitaképződés hiánya is ennél az embriónál (*az izomszövetek homogén és nem szegmentált megjelenése). A szívverés hiányának megfigyelésére irányadó idő legalább egy perc, minimum 80-szoros nagyítás mellett.

▼M7

C.50. *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*MAL VÉGZETT ÜLEDÉKMENTES TOXICITÁSI VIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 238. vizsgálati iránymutatásában (2014) leírt módszerrel. Célja a vegyi anyagok egy víz alatti kétszikű növénnyel, a süllőhínárok családjába tartozó *Myriophyllum spicatum*mal szembeni toxicitásának értékelése. A módszer alapját az ASTM egy meglévő vizsgálati módszere (1) képezi, amelyet egy üledékmentes vizsgálati rendszerré módosítottak (2), hogy meg lehessen becsülni a vizsgálati vegyi anyagok saját ökotoxicitását (függetlenül a vizsgálati vegyi anyag azon viselkedésétől, hogy hogyan oszlik el a víz és az üledék között). Az üledékmentes vizsgálati rendszer analitikai szempontból kevéssé bonyolult (csak a vizes fázisban), az eredmények pedig párhuzamosan vizsgálhatók és/vagy összevethetők a *Lemna sp*. vizsgálat (3) során kapott eredményekkel; emellett az előírt steril feltételek lehetővé teszik a mikroorganizmusok és algák hatásának (a vegyi anyag felvétele/bomlása stb.) lehető legkisebbre csökkentését. E vizsgálat nem helyettesíti a többi vízi toxicitási vizsgálatot, hanem inkább azok kiegészítőjeként szolgál, lehetővé téve, hogy teljesebb képet kaphassunk a vízinövényeket érő veszélyek és kockázatok értékeléséről. A vizsgálati módszer validálása laboratóriumok közötti összehasonlítással (4) történt.

2. Az alábbiak részletesen ismertetik a vizsgálati oldat cseréjével végzett (félstatikus) és a vizsgálati oldat cseréje nélkül végzett (statikus) vizsgálatokat. A vizsgálat céljától és a szabályozási követelményektől függően a félstatikus módszer alkalmazása ajánlott, például az oldatból gyorsan eltávozó (illékony, adszorbeáló, fény hatására lebomló, hidrolizáló, kicsapódó vagy biológiailag lebomló) anyagok esetén. További iránymutatást az (5) irodalom tartalmaz. E vizsgálati módszer azokra az anyagokra vonatkozik, amelyek tekintetében a módszert validálták (lásd a laboratóriumok közötti összehasonlítás vizsgálati jelentését (4)), illetve készítményekre vagy ismert keverékekre; amennyiben keveréket vizsgálnak, annak összetevőit lehetőség szerint azonosítani és számszerűsíteni kell. A *Myriophyllum spicatummal* végzett üledékmentes vizsgálati módszer kiegészíti a *Myriophyllum spicatummal* végzett víz–üledék rendszerű toxicitási vizsgálatot (6). A vizsgálati módszernek adott keverék szabályozási célú vizsgálatra történő használata előtt mérlegelni kell, hogy e módszer megfelelő eredményeket adhat-e e cél szempontjából, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

A VIZSGÁLAT ELVE

3. Folyamatosan növekedő, a *Myriophyllum spicatum* nemzetséghez tartozó növénytenyészeteket (kizárólag módosított Andrews-féle közegben, lásd a 2. függeléket) monokultúraként 14 napig növekedni kell hagyni a vizsgálati vegyi anyag különböző koncentrációinak jelenlétében, üledékmentes vizsgálati rendszerben. A vizsgálat célja a vizsgálat időtartama alatt a vegyi anyag vegetatív növekedésre gyakorolt hatásainak számszerű kifejezése választott mérési változók értékelése alapján. E mérési változók a hajtáshossz, az oldalágak és a gyökerek növekedése, továbbá a nedves és száraz tömeg alakulása és az örvök gyarapodása. Emellett figyelembe kell venni a vizsgálati szervezetben bekövetkező jellegzetes minőségi változásokat, például a torzulásokat vagy a klorózist és nekrózist, amelyekre a sárgulás, illetve a fehér és barna elszíneződés utal. A vegyi anyag hatásainak számszerű kifejezése érdekében a vizsgálati oldatban bekövetkező növekedést össze kell vetni a kontrolltenyészetben bekövetkező növekedéssel, és meg kell határozni azt az EC_x-szel kifejezett koncentrációt, amely egy adott x %-os növekedésgátlást idéz elő (az x a szabályozási követelmények függvényében bármilyen érték lehet, pl. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}). Meg kell jegyezni, hogy az EC_{10} és EC_{20} értékek becslése csak olyan vizsgálatokban megbízható és megfelelő, ahol a variációs koefficiens a kontrollnövényekben elmarad a becsült hatásszinttől, azaz a variációs koefficiens <20 % kell legyen az EC20 durva becslése esetén.

4. A kezelt és nem kezelt növények átlagos fajlagos növekedési sebességét (a fő hajtás hosszára és három további mérési változóra vonatkozó értékelésekből származó becslés alapján) és a hozamát (amelyet a fő hajtás hosszának és

▼M7

három további mérési változónak a növekedéséből kell becsülni) egyaránt meg kell határozni. A fajlagos növekedési sebességet (r) és a hozamot (y) ezt követően felhasználják az E_rC_x (pl. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}), illetve az E_yC_x (pl. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}) meghatározására.

5. Statisztikai eljárással meghatározható továbbá a megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC) és a megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) értéke is.

A VIZSGÁLATI VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

6. Rendelkezésre kell állnia olyan analitikai eljárásnak, amellyel a vizsgálati közegben lévő vizsgálati vegyi anyag mennyisége kellő pontossággal meghatározható. A vizsgálati körülmények meghatározása érdekében célszerű lehet tájékozódni többek között a vizsgálati vegyi anyag szerkezeti képletéről, tisztaságáról és a szennyezésekről, vízoldékonyságáról, vízben és fény hatására tanúsított stabilitásáról, sav disszociációs állandójáról (pK_a) és oktanol-víz megoszlási együtthatójáról (K_{OW}), gőznyomásáról és biológiai lebonthatóságáról. A vízoldékonyságból és a gőznyomásból meghatározható a Henry-állandó, amely megmutatja, mennyire valószínű, hogy a vizsgálat során a vizsgálati vegyi anyag jelentős mennyiségben eltávozik. Ennek alapján eldönthető, kell-e külön gondoskodni az így adódó veszteségek ellensúlyozásáról. Ha a vizsgálati vegyi anyag oldhatóságára és stabilitására vonatkozó információk bizonytalanok, célszerű ezeket a vizsgálat körülményei, azaz a vizsgálatban alkalmazandó tápoldat, hőmérséklet és fényviszonyok mellett meghatározni.

7. Különösen fontos a vizsgálati közeg pH-értékének szabályozása, például fémek vagy könnyen hidrolizálódó anyagok vizsgálata esetén. Az OECD iránymutatása (5) további útmutatást ad olyan vegyi anyagok vizsgálatához, amelyek fizikai-kémiai tulajdonságaiknál fogva nehezen vizsgálhatók.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

8. A vizsgálat érvényességéhez a fő hajtás hosszának megkétszereződéséhez szükséges idő a kontrollban kevesebb kell, hogy legyen 14 napnál. Az e vizsgálati módszerben ismertetett közegek és vizsgálati körülmények alkalmazása esetén ez a feltétel statikus vagy félstatikus vizsgálati rendszerrel kielégíthető.

9. A hozam variációs koefficiensének átlaga a hajtások nedves tömegének (a vizsgálat kezdete és vége közötti) mérése és további mérési változók alapján (lásd a 37. pontot) a kontrolltenyészetekben nem haladhatja meg a 35 %-ot a párhuzamosok között.

10. A kontrollcsoport párhuzamosainak több mint 50 %-át steril körülmények között kell tartani a 14 napos expozíciós időszakban, ami azt jelenti, hogy az oldat láthatóan mentes kell, hogy legyen más szervezetek, például algák, gombák és baktériumok okozta szennyeződésektől (tiszta oldat). Megjegyzés: A sterilitás méréséhez a laboratóriumok közötti összehasonlítás vizsgálati jelentése (4) nyújt útmutatást.

REFERENCIA-VEGYIANYAG

11. Referencia-vegyianyago(ka)t, például a laboratóriumok közötti összehasonlítás (4) során használt 3,5-diklórfenolt vizsgálni lehet a vizsgálati eljárás ellenőrzése érdekében; a laboratóriumok közötti összehasonlítás adatai alapján a 3,5-diklórfenol EC_{50} átlagértékei a különböző hatásváltozók tekintetében (lásd e vizsgálati módszer 37–41. pontját) 3,2 mg/l és 6,9 mg/l között vannak (lásd a laboratóriumok közötti összehasonlítás vizsgálati jelentését ezen értékek konfidencia-intervallumai tekintetében). Referencia-vegyianyaggal legalább évente kétszer (ha ennél ritkábban végeznek vizsgálatot, akkor a vizsgálati vegyi anyag toxicitásának meghatározásával párhuzamosan) ajánlott vizsgálatot végezni.

▼M7

A MÓDSZER ISMERTETÉSE

Felszerelés

12. Minden, a vizsgálati közeggel érintkező eszköznek üvegből vagy más, kémiailag semleges anyagból kell lennie. A tenyésztés és a vizsgálat céljára felhasznált üvegeszközöknek sterilnek kell lenniük, és azokat meg kell tisztítani minden olyan kémiai szennyeződéstől, amely a vizsgálati közegbe bemosódhatna. A vizsgálati edényeknek kellően hosszúnak kell lenniük ahhoz, hogy a kontrolltenyészetekben a különböző hajtások a vizes fázisban a vizsgálat végéig növekedhessenek anélkül, hogy a vizsgálati közeg felszínét elérnék. Javasolt olyan tömör falú, boroszilikát üvegből készült, alumíniumkupakkal ellátott, perem nélküli kémcsöveket használni, amelyek átmérője megközelítőleg 20 mm, hossza körülbelül 250 mm.

13. Mivel a módosított Andrews-féle közeg szacharózt tartalmaz (amely kedvez a gombák és baktériumok növekedésének), a vizsgálati oldatokat steril körülmények között kell elkészíteni. Valamennyi folyadékot és berendezést a használat előtt sterilizálni kell. A sterilizációt 4 órás hőkezeléssel (210 °C) kell elvégezni, vagy autoklávval 121 °C-on 20 percig. Emellett minden lombikot, edényt, tálat stb. és egyéb eszközt lángkezelésnek kell alávetni közvetlenül a használat előtt steril munkaasztalon.

14. A tenyészeteket és a vizsgálati edényeket nem szabad együtt tartani. A legjobb megoldás a külön környezeti növesztőkamrák, inkubátorok vagy helyiségek igénybevétele. A fényviszonyok és a hőmérsékletek szabályozhatók legyenek, és állandó szinten kell azokat tartani.

Vizsgálati szervezet

15. *Myriophyllum spicatum* – a süllőhínárok családjába tartozó, víz alatti kétszikű növény. Június és augusztus között nem feltűnő, rózsaszín/fehér virágok törnek a vízfelszínre. A növények erős rizómarendszerrel a talajban gyökereznek, és a teljes északi féltekén megtalálhatók tápanyagban gazdag, ugyanakkor nem szennyezett és magas mésztartalmú állóvizekben, sáros táptalajban. A *Myriophyllum spicatum* az édesvizet kedveli, de brakkvízben is megél.

16. Az üledékmentes toxicitási vizsgálathoz steril növényekre van szükség. Ha a vizsgálatot végző laboratóriumban nem áll rendelkezésre rendszeresen *Myriophyllum spicatum* tenyészet, a steril növényanyagot be lehet szerezni más laboratóriumtól vagy a (nem steril) növény begyűjthető terepről, illetve beszerezhető kereskedelmi beszállítótól; ha a növények terepről származnak, elő kel irányozni a faj taxonómiai ellenőrzését. A terepről származó vagy kereskedelmi beszállító által átadott növényeket sterilizálni kell (1), és felhasználás előtt legalább nyolc hétig a vizsgálat során alkalmazandóval megegyező közegben kell tartani. A tenyészet kialakításához a növényanyagot nyilvánvaló szennyeződéstől mentes helyszínről kell begyűjteni. Nagyfokú gondossággal kell eljárni annak biztosítása érdekében, hogy a megfelelő fajt találják meg a *Myriophyllum spicatum* terepről való begyűjtésekor, különösen azokon a területeken, ahol az más *Myriophyllum* fajokkal hibridet alkothat. A más laboratóriumból származó növényanyagot legalább három hétig kell hasonló körülmények között tartani. A jelentésben mindig rögzíteni kell a növényanyag eredetét és a vizsgálathoz felhasznált fajt.

17. A vizsgálat során felhasznált növények minősége és egységessége jelentősen befolyásolja a vizsgálat eredményeit, ezért megválasztásuk során kellő gondossággal kell eljárni. Fiatal, gyorsan növekvő, látható sérüléstől és fakulástól (klorózistól) mentes egyedeket kell felhasználni. A vizsgálati szervezet előkészítését részletesen a 4. függelék ismerteti.

Tenyésztés

18. Az átoltás gyakoriságának csökkentése érdekében (például ha egy ideig előreláthatóan nem terveznek *Myriophyllum*-vizsgálatokat) a tenyészet csökkentett fényviszonyok mellett és hőmérsékleten (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) tartható. A tenyésztés körülményeit részletesen a 3. függelék ismerteti.

▼M7

19. A vizsgálatok előtt legalább 14–21 nappal elegendő mennyiségű vizsgálati szervezetet csíramentesen friss, steril közegbe kell áthelyezni, majd 14–21 napon át a vizsgálatnak megfelelő körülmények között tartani előkultúraként. Az előkultúra elkészítését részletesen a 4. függelék ismerteti.

Vizsgálati közeg

20. A *Myriophyllum spicatum* tekintetében egyetlen táptalaj javasolt a 2. függelékben leírt üledékmentes vizsgálati rendszerben. Ajánlott az Andrews-féle közeg módosítása a *Myriophyllum spicatum* tenyésztésére és vizsgálatára, amint azt az (1) irodalom ismerteti. A módosított Andrews-féle közeg beállítható 3 % szacharóz öt külön elkészített tápanyag-törzsoldathoz való hozzáadásával. A közeg elkészítését részletesen a 2. függelék ismerteti.

21. Tízszeres koncentrációjú módosított Andrews-féle közegre van szükség a vizsgálati oldatok (lehetőség szerint hígítással történő) elkészítéséhez. E közeg összetételét a 2. függelék ismerteti.

Vizsgálati oldatok

22. A vizsgálati oldatokat általában törzsoldat hígításával kell előállítani. A vizsgálati vegyi anyag törzsoldatait általában úgy kell készíteni, hogy a vegyi anyagot ásványmentesített (azaz desztillált vagy ioncserélt) vízben feloldják. A tápanyagok hozzáadása a tízszeres koncentrációjú, módosított Andrews-féle közeg felhasználásával történik.

23. A vegyi anyag törzsoldata sterilizálható autoklávban 121 °C-on 20 percig, vagy steril szűréssel, feltéve hogy a sterilizálásra szolgáló módszer nem semlegesíti a vegyi anyagot A vizsgálati oldatok elkészíthetők steril ásványmentesített vízben vagy közegben, steril körülmények között. A vizsgálati vegyi anyag törzsoldatainak sterilizálására szolgáló eljárás megválasztása során figyelembe kell venni a hőstabilitást és a különböző felületeken való adszorpciót. Ezért javasolt, hogy a törzsoldatokat steril körülmények között készítsék el, azaz a vizsgálati vegyi anyag steril körülmények közötti, steril vízben való oldásához szükséges steril eszközök felhasználásával (pl. lángsterilizálás, lamináris áramlású fülkék stb.). A steril törzsoldat elkészítésére szolgáló e technika mind az anyagok, mind a keverékek esetén érvényes.

24. A vizsgálati vegyi anyag legmagasabb vizsgált koncentrációja általában nem haladhatja meg a vegyi anyag vizsgálati körülmények között érvényes vízoldékonyságát. Vízben kis mértékben oldódó vizsgálati vegyi anyag esetén szükséges lehet szerves oldó- vagy diszpergálószer alkalmazásával nagy koncentrációjú törzsoldatot vagy -diszperziót készíteni annak érdekében, hogy könnyebb legyen a vizsgálati vegyi anyagból a pontos mennyiséget a vizsgálati közegbe adagolni, és könnyebben végbemenjen az oldódás vagy a diszperzió. Ilyen anyag alkalmazását lehetőség szerint kerülni kell. A segédoldószer vagy -diszpergálószer alkalmazása nem járhat fitotoxikus hatással. A széles körben alkalmazott oldószerek közül például az aceton vagy a dimetil-formamid 100 µl/l koncentrációig nem okoz fitotoxikus hatást. Az esetleg alkalmazott oldó- vagy diszpergálószer végső koncentrációja – amelyet a jelentésben rögzíteni kell – a lehető legalacsonyabb kell, hogy legyen (≤100 µl/l), és az oldó- vagy diszpergálószert a kezelt és a kontrolltenyészet esetében azonos koncentrációban kell alkalmazni. Az (5) irodalom bővebb iránymutatást ad a diszpergálószerekre vonatkozóan.

Vizsgálati csoportok és kontrollcsoportok

25. A vizsgálati vegyi anyag *Myriophyllum spicatum*ra gyakorolt toxikus hatásának előzetes ismerete alapján, amely származhat dózisbehatároló vizsgálatból, megválaszthatók az alkalmas vizsgálati koncentrációk. A meghatározó toxicitási

▼M7

vizsgálatban szokásosan (az e melléklet C.26. fejezetében olvasható *Lemna* növekedésgátlási próbára jellemző) öt–hét vizsgálati koncentrációt kell mértani sorba rendezni; ezeket oly módon kell megválasztani, hogy az NOEC és EC_{50} értékek a koncentrációs tartományon belül legyenek (lásd alább). A koncentrációk közötti szorzótényező általában ne legyen 3,2-nél nagyobb, de lapos koncentráció–hatás görbe esetén ennél nagyobb érték lehet indokolt. Ötnél kevesebb vizsgálati koncentráció használatát indokolni kell. Minden koncentráció tekintetében legalább öt párhuzamost kell beállítani.

26. A vizsgálati koncentrációk tartományának kijelölése során (akár dózisbehatároló vizsgálatot, akár a meghatározó vizsgálatot megelőzően) a következőket célszerű megfontolni.

Az EC_x meghatározásához a megfelelő konfidenciaszint biztosítása érdekében a vizsgálati koncentrációknak közre kell fogniuk az EC_x értéket. Az EC_{50} érték becslésekor például a legmagasabb vizsgálati koncentrációnak nagyobbnak kell lennie az EC_{50} értéknél. Ha az EC_{50} érték kívül esik a vizsgálati koncentrációk tartományán, akkor a kiadódó konfidencia-intervallumok tágak lesznek, és előfordulhat, hogy nem végezhető el a modell statisztikai illeszkedésének megfelelő értékelése.

LOEC és/vagy NOEC meghatározása esetén a legalacsonyabb vizsgálati koncentráció legyen elegendően alacsony ahhoz, hogy a növekedés ne legyen jelentősen kisebb, mint a kontrollcsoportban. A legmagasabb koncentráció ugyanakkor legyen elegendően nagy ahhoz, hogy a növekedés jelentősen kisebb legyen, mint a kontrollcsoportban. Ha ez nem teljesül, a vizsgálatot más koncentrációtartománnyal meg kell ismételni (kivéve akkor, ha a legmagasabb koncentráció megegyezik az oldhatósági határral vagy az előírt maximális határkoncentrációval, például 100 mg/l-rel).

27. Az egyes vizsgálatok mellett kontrolltenyészeteket is kell vizsgálni a vizsgálati edényekével megegyező táptalaj, vizsgálati szervezet (a megválasztott növényanyagoknak a lehető leghomogénebbnek kell lenniük; azt az előkultúrából származó friss oldalágak alkotják, amelyeket a tőtől számított 2,5 cm-re vágnak vissza), a vizsgálati edényekével megegyező környezeti körülmények és eljárások alkalmazásával, de a vizsgálati vegyi anyag nélkül. Segédoldószer vagy -diszpergálószer alkalmazása esetén egy további kontrolltenyészet is szükséges, amelyben az oldó- vagy diszpergálószer azonos koncentrációban van jelen, mint a vizsgálati vegyi anyagot tartalmazó edényekben. Legalább tíz párhuzamost kell alkalmazni a kontrolledények (illetőleg szükség szerint az oldószeres edények) esetén.

28. Ha nem kell meghatározni az NOEC értékét, a vizsgálati terv módosítható oly módon, hogy több koncentrációt, de koncentrációnként kevesebb párhuzamost tartalmazzon. A kontrollban a párhuzamosok száma azonban ilyenkor is legalább tíz kell, hogy legyen.

Expozíció

29. A tőtől számítva 2,5 cm-re visszavágott, az előkultúrából származó friss oldalágakat véletlenszerűen kell kiosztani a vizsgálati edényekbe, csíramentes körülmények között; az egyes vizsgálati edényekbe egy 2,5 cm-es oldalágat kell behelyezni, amelynek egyik végén csúcsmerisztémának kell lennie. Az egyes vizsgálati edényekben a választott növényanyagnak azonos minőségűnek kell lennie.

30. Az inkubátorban a vizsgálati edényeket véletlenszerű elrendezésben kell elhelyezni annak érdekében, hogy a fényerősség és a hőmérséklet térbeli változatossága minél kisebb hatást gyakoroljon a vizsgálatokra. A megfigyelések végzésekor az edényeket véletlenszerűen vagy blokkonkénti kiosztási terv alapján (vagy gyakrabban) át kell rendezni.

31. Ha az előzetesen elvégzett stabilitásvizsgálat azt jelzi, hogy a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja a vizsgálat időtartama (14 nap) alatt nem tartható fenn (azaz a mért koncentráció a kezdeti mért koncentráció 80 %-a alá csökken), akkor félstatikus vizsgálatot ajánlatos végezni. Ennek keretében a növényeket a vizsgálat során legalább egy alkalommal (pl. a 7. napon) friss vizsgálati és

▼M7

kontrolloldatokba kell helyezni. A friss közegbe helyezés gyakorisága a vizsgálati vegyi anyag stabilitásától függ; nagymértékben instabil vagy illékony anyagok esetén a közel állandó koncentráció fenntartása gyakoribb oldatcserét igényelhet.

32. Ez a vizsgálati módszer nem tartalmazza a levélre történő felvitellel (permetezéssel) megvalósuló expozíciót.

Vizsgálati körülmények

33. Meleg- és/vagy hidegfehér fluoreszkáló megvilágítást kell alkalmazni oly módon, hogy a fotoszintetikusan aktív sugárzásban (400–700 nm), a fényforrástól a vizsgálati edények aljával megegyező távolságban lévő pontokban mért irradiancia 100–150 μE m^{-2} s^{-1} legyen (amely körülbelül 6 000–9 000 luxnak felel meg); a fény/sötét ciklusnak pedig 16/8 órásnak kell lennie. A fényérzékelésének és mérésének módszere, különösen az érzékelők típusa befolyásolja a mért értéket. A gömbérzékelők (amelyek a mérési sík alatt és felett tetszőleges irányból érkező fény mérésére alkalmasak) és a „koszinuszos” érzékelők (amelyek csak a mérési sík felett tetszőleges irányból érkező fény mérésére alkalmasak) előnyben részesítendők az egytengelyű érzékelőkkel szemben, mert az e módszerben előírt többpontos fényforrás esetén nagyobb értékeket szolgáltatnak.

34. A vizsgálati edényekben a hőmérsékletnek 23 ± 2 °C-nak kell lennie. További gondot kell fordítani a pH-érték eltolódására egyes esetekben, pl. instabil vegyi anyagok vagy fémek vizsgálatakor; a pH-értéknek 6–9 közötti tartományban kell maradnia. További iránymutatást az (5) irodalom tartalmaz.

Időtartam

35. A vizsgálat a növények vizsgálati edényekbe helyezése után 14 nappal fejeződik be.

Mérések és analitikai meghatározások

36. A vizsgálat kezdetén a vizsgálati szervezet fő hajtásának hossza 2,5 cm (lásd a 29. pontot); ezt vonalzóval kell megmérni (lásd a 4. függeléket), vagy fényképezéssel és képelemzéssel kell megállapítani. A vizsgálati szervezet normálisnak vagy rendellenesnek tűnő fő hajtásának hosszát a vizsgálat kezdetén, továbbá a 14 napos expozíciós időszak alatt legalább egyszer és a vizsgálat végén kell meghatározni. Megjegyzés: Alternatívaként azok számára, akik nem rendelkeznek képelemzési lehetőséggel, ha a munkaasztalt sterilizálják a növények vizsgálati edényekbe helyezése előtt, steril vonalzó használható a fő hajtás hosszának mérésére a vizsgálat kezdetén és a vizsgálat során. Fel kell jegyezni a növények fejlődésében beálló változásokat, például a hajtások deformitását vagy a megjelenést, a nekrózisra, a klorózisra utaló jeleket, a megszakadást vagy az úszóképesség megszűnését, a gyökerek hosszának vagy megjelenésének megváltozását. Fel kell továbbá jegyezni a vizsgálati közeg jellegzetességeit is (például oldatlan anyag jelenléte, alga-, gomba- vagy baktériumképződés a vizsgálati edényben).

37. A vizsgálat során a fő hajtás hossza mellett a vizsgálati vegyi anyagnak a következő mérési változók közül háromra (vagy többre) gyakorolt hatását is meg kell határozni:

i. Az oldalágak teljes hossza

ii. A hajtások teljes hossza

iii. A gyökerek teljes hossza

iv. Nedves tömeg

v. Száraz tömeg

vi. Örvök száma

▼M7

1. megjegyzés: A dózisbehatároló vizsgálat során tett megfigyelések segíthetnek a fent felsorolt hat változó közül a megfelelő további mérések kiválasztásában.

2. megjegyzés: Határozottan javasolt a nedves és száraz tömeg meghatározása (iv. és v. paraméter).

3. megjegyzés: Mivel a szacharóz és a fény (a gyökerek fénynek való kitettsége a vizsgálat során) hatást gyakorolhat a növények növekedési hormonjának, az auxinnak a transzportereire, és mivel egyes vegyi anyagok hatásmechanizmusa auxin típusú lehet, a gyökérre vonatkozó végpontok felvétele (iii. paraméter) megkérdőjelezhető.

4. megjegyzés: A laboratóriumok közötti összehasonlítás magas variációs koefficienst mutat (> 60 %) az oldalágak teljes hossza tekintetében (i. paraméter). Az oldalágak teljes hosszára mindenesetre kiterjed a hajtások teljes hosszának mérése (ii. paraméter), amely elfogadhatóbb variációs koefficienst mutat (< 30 %).

5. megjegyzés: A fenti megfontolásokból kiindulva az ajánlott mérési végpontok a következők: a hajtások teljes hossza, a nedves és a száraz tömeg (ii., iv. és v. paraméter); a vi. paraméterről, az örvök számáról a kísérletet végző saját megítélése alapján dönthet.

38. A fő hajtás hossza és az örvök száma azért előnyös mérési változók, mert a vizsgálat kezdetén, folyamán és végén minden vizsgálati és kontrolledényben külön-külön meghatározhatók fényképezéssel és képelemzéssel, jóllehet (steril) vonalzó is használható.

39. Az oldalágak teljes hossza, a gyökerek teljes hossza (mint az összes oldalág vagy összes gyökér összege) és a hajtások teljes hossza (mint a fő hajtás hossza és az oldalágak teljes hossza) vonalzóval mérhető az expozíció végén.

40. A száraz és/vagy a nedves tömeget a vizsgálat elején a vizsgálat megkezdéséhez alkalmazandó növények tekintetében reprezentatív előkultúrából származó mintán, majd a vizsgálat végén az egyes vizsgálati és kontrolledények növényanyagán kell meghatározni.

41. Az oldalágak teljes hosszát, a hajtások teljes hosszát, a gyökerek teljes hosszát, a nedves és a száraz tömeget, továbbá az örvök számát a következőképpen kell meghatározni:

i. Az oldalágak teljes hossza: Az oldalágak hosszát úgy lehet meghatározni, hogy az összes oldalágat vonalzóval lemérik az expozíció végén. Az oldalágak teljes hossza az egyes vizsgálati és kontrolledényekben található összes oldalág hosszának összege.

ii. A hajtások teljes hossza: A fő hajtás hosszát képelemzéssel vagy vonalzó segítségével lehet megállapítani. A hajtások teljes hossza az egyes vizsgálati és kontrolledényekben található oldalágak teljes hosszának és a fő hajtás hosszának összege az expozíció végén.

iii. A gyökerek teljes hossza: A gyökér hosszát úgy lehet meghatározni, hogy az összes gyökeret vonalzóval lemérik az expozíció végén. A gyökerek teljes hossza az egyes vizsgálati és kontrolledényekben található összes gyökér összege.

iv. Nedves tömeg: A nedves tömeget úgy lehet meghatározni, hogy a vizsgálati szervezetek tömegét megmérik az expozíció végén. Az egyes vizsgálati és kontrolledényekben található valamennyi növényanyagot desztillált vízzel le kell öblíteni és cellulózpapírral szárazra kell itatni. Ezen

▼M7

előkészületeket követően a nedves tömeget méréssel határozzák meg. A kezdeti élőanyag-tömeget (nedves tömeg) a vizsgálati edények beoltásához használt tételből származó vizsgálati szervezetekből vett minta alapján kell meghatározni.

v. Száraz tömeg: A nedves tömeg meghatározásának előkészületeit követően a vizsgálati szervezeteket 60 °C-on állandó tömegűre kell szárítani. Ez a tömeg a száraz tömeg. A kezdeti élőanyag-tömeget (száraz tömeg) a vizsgálati edények beoltásához használt tételből származó vizsgálati szervezetekből vett minta alapján kell meghatározni.

vi. Örvök száma: A fő hajtás mentén valamennyi örvöt meg kell számlálni.

A mérések és az analitikai meghatározások gyakorisága

42. Statikus vizsgálati terv alkalmazása esetén az egyes kezelt edények pH-értékét a vizsgálat elején és végén kell megmérni. Félstatikus vizsgálati terv alkalmazása esetén a pH-értéket minden oldatcsere alkalmával meg kell határozni mind a friss, mind az elhasznált oldaton.

43. A fényerősséget a növesztőkamrában, az inkubátorban vagy a vizsgálati helyiségben a fényforrástól a vizsgálati szervezetekkel megegyező távolságban elhelyezkedő pontokban kell mérni. Fényerősséget a vizsgálat során legalább egyszer kell mérni. A növesztőkamrában, az inkubátorban vagy a vizsgálati helyiségben azonos körülmények között külön erre a célra tartott edényben legalább naponta (vagy adatgyűjtő egységgel folyamatosan) méni kell a közeg hőmérsékletét.

44. A vizsgálat során alkalmas időközönként meg kell határozni a vizsgálati vegyi anyag(ok) koncentrációját. Statikus vizsgálat esetén a koncentrációt legalább a vizsgálat elején és végén meg kell határozni.

45. Félstatikus vizsgálat esetén, ha a vizsgálati vegyi anyag(ok) koncentrációja várhatóan nem marad a névleges koncentráció ±20 %-os tartományában, akkor minden friss vizsgálati oldatot elkészítésekor, továbbá minden lecserélt oldatot analitikai vizsgálatnak kell alávetni. Olyan vizsgálatok esetén ugyanakkor, amelyekben a vizsgálati vegyi anyag(ok) mért kezdeti koncentrációja ugyan nem a névleges koncentráció ±20 %-os tartományában van, de kellően bizonyítható, hogy a kezdeti koncentrációk megismételhetők és stabilak (azaz a kezdeti koncentráció 80–120 %-os tartományán belül vannak), akkor a kémiai meghatározásokat elegendő csak a legalacsonyabb és a legmagasabb vizsgálati koncentráción elvégezni. Az oldatcsere előtt a vizsgálati koncentrációt minden esetben elegendő vizsgálati koncentrációnként egy párhuzamos edényen (vagy a párhuzamosokat összevontan tartalmazó edényen) elvégezni.

46. Ha bizonyított, hogy a vizsgálati koncentráció kielégítő módon a névleges koncentráció vagy a mért kezdeti koncentráció ±20 %-án belül marad a vizsgálat során, akkor az eredmények értékelése alapulhat a névleges értéken vagy a mért kezdeti koncentráció értékén. Ha a névleges vagy a mért kezdeti koncentrációtól való eltérés meghaladja a ±20 %-ot, akkor az eredményeket az expozíció idején érvényes koncentrációértékek mértani középértéke vagy a vizsgálati vegyi anyag koncentrációjának csökkenését leíró modellek alapján kell elemezni (5).

Határérték-vizsgálat

47. Egyes esetekben, például ha egy előzetes vizsgálat azt jelzi, hogy a vizsgálati vegyi anyag 100 mg/l koncentrációig vagy az adott vizsgálati közegben való oldhatósági határig, illetőleg készítmény esetén a diszpergálóképesség határáig nem jár toxikus hatással, akkor egy kontrollcsoport és egyetlen (100 mg/l koncentrációnak vagy az adott vizsgálati oldatban való oldhatósági határhoz

▼M7

tartozó koncentrációnak megfelelő) kezelt csoport válaszainak összehasonlításával határérték-vizsgálat végezhető. Határozottan ajánlott ezt az expozíciós koncentráció elemzésével alátámasztani. A határérték-vizsgálat során biztosítani kell valamennyi fent leírt vizsgálati körülmény fennállását és érvényességi feltétel teljesülését azzal az eltéréssel, hogy kétszer annyi kezelt replikátumot kell vizsgálni. A kontrollcsoportban és a kezelt csoportban tapasztalt növekedés az átlagok összehasonlítására irányuló statisztikai próbával (például Student-féle t-próbával) elemezhető.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Hatásváltozók

48. A vizsgálat célja annak meghatározása, milyen hatást gyakorol a vizsgálati vegyi anyag a *Myriophyllum spicatum* vegetatív növekedésére. Ez a vizsgálati módszer két hatásváltozót ír le.

a) Átlagos fajlagos növekedési sebesség: Ezt a hatásváltozót a fő hajtás hossza logaritmusának, valamint más további mért paraméterek (a hajtások teljes hossza, a száraz tömeg vagy a nedves tömeg, az örvök száma) logaritmusának időbeli (napi) változása alapján kell kiszámítani a kontroll- és az egyes kezelt csoportokban. Megjegyzés: Az oldalágak teljes hossza és a gyökerek teljes hossza mérési paraméterek tekintetében nem számítható átlagos fajlagos növekedési sebesség. A vizsgálat elején a vizsgálati szervezetnek nincs oldalága és gyökérzete (az előkultúrából származó preparátum alapján); a nulla értékről kiindulva az átlagos fajlagos növekedési sebességet nem határozzák meg.

b) Hozam: Ezt a hatásváltozót a fő hajtás hossza, valamint más további mért paramétereknek (azaz lehetőség szerint a hajtások teljes hosszának, a nedves tömegnek, a száraz tömegnek vagy az örvök számának) a kontroll- és az egyes kezelt csoportokban a vizsgálat végéig bekövetkező változása alapján kell kiszámítani.

49. A toxicitást a fő hajtás hossza, valamint három további mérési változó (azaz lehetőség szerint a hajtások teljes hossza, a nedves tömeg, a száraz tömeg vagy az örvök száma, lásd a 37. pontot és az e ponthoz fűzött 2., 4. és 5. megjegyzést) alapján kell becsülni, mert bizonyos vegyi anyagok más mérési változókat sokkal erősebben befolyásolhatnak, mint a fő hajtás hosszát. Ez a hatás nem volna kimutatható csak a fő hajtás hosszának kiszámításával.

Átlagos fajlagos növekedési sebesség

50. Az adott időszakhoz tartozó átlagos fajlagos növekedési sebességet a növekedést leíró változók – a fő hajtás hossza, valamint három további mérési változó (azaz a hajtások teljes hossza, a nedves tömeg, a száraz tömeg vagy az örvök száma) – logaritmusának növekedéseként kell kiszámítani a vizsgálati és a kontrollcsoportok minden egyes párhuzamosára külön-külön, a következő összefüggés szerint:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

ahol:

μ_{i-j}: az átlagos fajlagos növekedési sebesség az „i”-től a „j” időpillanatig

N_i: a mérési változó értéke a vizsgálati vagy a kontrolledényben az „i” időpillanatban

N_j: a mérési változó értéke a vizsgálati vagy a kontrolledényben a „j” időpillanatban

t: az „i”-től „j”-ig terjedő időtartam.

▼M7

Minden kezelt és kontrollcsoportra ki kell számítani egy átlagot a növekedési sebességre, valamint meg kell becsülni a szórásnégyzetet.

51. Az átlagos fajlagos növekedési sebességet a vizsgálat teljes időtartamára kell meghatározni (tehát úgy, hogy a fenti összefüggésben „i” a vizsgálat kezdetét, „j” a vizsgálat végét jelöli). Minden egyes vizsgálati koncentrációra és kontrollcsoportra meg kell határozni az átlagos fajlagos növekedési sebesség átlagát, és meg kell becsülni a szórásnégyzetet. Emellett (például a növekedési görbék logaritmikus transzformáltjának szemügyre vételével) meg kell adni a növekedési sebesség szakaszonkénti értékét is annak érdekében, hogy megítélhető legyen a vizsgálati vegyi anyag által az expozíciós időszak folyamán kifejtett hatás.

52. A növekedési sebesség százalékos gátlását (I_r) ezután vizsgálati koncentrációnként (kezelt csoportonként) a következő összefüggésből kell meghatározni:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

ahol:

% Ir: átlagos fajlagos növekedési sebesség százalékos gátlása

μC: a μ átlaga a kontrollban

μT: a μ átlaga a kezelt csoportban

Hozam

53. A hozamra gyakorolt hatást vizsgálati edényenként, a fő hajtás hossza és három további mérési változó (azaz lehetőség szerint a hajtások teljes hossza, a nedves tömeg, a száraz tömeg vagy az örvök száma) alapján kell meghatározni a vizsgálat kezdetén és végén. A kezdeti élőanyag-tömeget (a nedves tömeg vagy a száraz tömeg tekintetében) a vizsgálati edények beoltásához használt tételből származó vizsgálati szervezetekből vett minta alapján kell meghatározni. Minden egyes vizsgálati koncentráció és kontrollcsoport esetén ki kell számítani a hozam átlagát, és meg kell becsülni a szórásnégyzetet. Az átlagos százalékos hozamgátlás (% I_y) kezelt csoportonként a következő összefüggésből határozható meg:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

ahol:

% Iy: a hozam százalékos csökkenése

bC: az élőanyag-tömeg végső értéke és kiindulási értéke közötti különbség a kontrollcsoportban

bT: az élőanyag-tömeg végső értéke és kiindulási értéke közötti különbség a kezelt csoportban.

Megkettőződési idő

54. A fő hajtás hossza megkettőződéséhez szükséges T_d idő meghatározásához és az erre vonatkozó érvényességi kritérium (lásd a 8. pontot) betartásához a kontrolledények adataira a következő összefüggést kell alkalmazni:

$T_d = \ln 2/\mu$

Ahol μ az 50–52. pontban leírtak szerint meghatározott átlagos fajlagos növekedési sebesség.

▼M7

A koncentráció–hatás görbék elkészítése

55. El kell készíteni a hatásváltozóhoz tartozó átlagos százalékos gátlás értékét (az 53. pont szerint számított I_r, vagy I_y értéket) a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja logaritmusának függvényében ábrázoló koncentráció–hatás görbéket.

Az EC_x becslése

56. Az EC_x becslését mind az átlagos fajlagos növekedési sebesség (E_rC_x), mind a hozam (E_yC_x) alapján el kell végezni, amelyeket viszont a fő hajtás hosszából és lehetőség szerint további mérési változókból (azaz elsődlegesen a hajtások teljes hosszából, a száraz tömegből, a nedves tömegből vagy az örvök számából) egyaránt ki kell számítani. Ez azért szükséges, mert egyes vegyi anyagok a fő hajtás hosszára és a többi mérési változóra eltérő hatást gyakorolnak. A kívánt toxicitási paraméterek tehát négy EC_x érték az egyes x gátlási szintre számítva: E_rC_x (fő hajtás hossza); E_rC_x (azaz elsődlegesen a hajtások teljes hossza, a száraz tömeg, a nedves tömeg vagy az örvök száma); E_yC_x (fő hajtás hossza); és E_yC_x (azaz lehetőség szerint a hajtások teljes hossza, a nedves tömeg, a száraz tömeg vagy az örvök száma).

57. Megjegyzendő, hogy az e két hatásváltozó alapján számított EC_x értékek nem hasonlíthatók egymáshoz, és a vizsgálati eredmények felhasználása során erre a különbségre tekintettel kell lenni. Az e vizsgálati módszerben előírt vizsgálati körülmények betartása mellett a két számítási eljárás matematikai háttere következtében az átlagos fajlagos növekedési sebességen alapuló EC_x értékek (E_rC_x) általában nagyobbra adódnak, mint a hozamon alapuló EC_x értékek (E_yC_x). Ezt az eltérést nem szabad úgy értelmezni, hogy egyik hatásváltozó érzékenyebb lenne a másiknál; egyszerűen arról van szó, hogy a két érték matematikailag mást jelent.

Statisztikai eljárások

58. A statisztikai számítások célja, hogy regresszióanalízissel kvantitatív koncentráció–hatás összefüggést állítsanak elő. Használható súlyozott lineáris regresszió, a hatásadatok például probit-, logit- vagy Weibull-modellekkel történő lineáris transzformációja után (7), de célszerű előnyben részesíteni a nem lineáris regressziós technikákat, amelyek jobban kezelik az elkerülhetetlen adatszabálytalanságokat és az egyenletes eloszlástól való eltéréseket. Akár a nulla gátlás, akár a teljes gátlás közelében a transzformáció megsokszorozhat bizonyos szabálytalanságokat, ami hibás elemzést eredményezhet (7). Megjegyzendő, hogy a probit-, logit- vagy Weibull-transzformáltat alkalmazó szokásos számítási módszerek elsősorban kvantált (például mortalitás kontra túlélés) adatok feldolgozására alkalmasak, így módosítást igényelnek, ha a növekedési sebességre vagy a hozamra kívánják azokat alkalmazni. Az EC_x értékek folytonos adatokból való számítására alkalmas módszerek a (8), (9) és (10) irodalomban találhatók.

59. Az egyes hatásváltozók elemzéséhez a koncentráció–válasz összefüggésből ki kell számítani az EC_x egyes pontokban becsült értékét. Ha lehetséges, meg kell határozni az egyes becslések 95 %-os konfidenciahatárát. A hatásadatok regressziós modellhez történő megfelelő illeszkedését (goodness of fit) grafikus vagy statisztikai módszerrel kell megállapítani. A regresszióanalízist az egyes párhuzamosokon nyert hatásokkal, nem pedig a kezelt csoportok átlagaival kell elvégezni.

60. Az EC_{50} becsült értékeit és a konfidenciahatárokat bootstrap módszerrel együtt alkalmazott lineáris interpolációval (10) is meg lehet kapni, ha a rendelkezésre álló regressziós modellek/módszerek nem használhatók a kapott adatokkal.

61. Az LOEC, és így az NOEC becsült értékének előállítása érdekében varianciaanalízis (ANOVA) segítségével össze kell vetni az egyes kezelésekhez tartozó átlagokat. Az egyes koncentrációkhoz tartozó átlagokat ezután alkalmasan megválasztott többszörös összehasonlító módszerrel vagy trendpróbát alkalmazó módszerrel a kontrollcsoporton nyert átlagokhoz kell hasonlítani. A Dunnett- vagy a Williams-féle próba hasznos lehet erre a célra (12)(13)(14)(15)(16). Lényeges ellenőrizni, hogy fennáll-e az ANOVA-nak a szórásnégyzetek homogenitására vonatkozó feltevése. Ez történhet grafikusan vagy formális próbával (15). A megfelelő tesztek a Levene- vagy a

▼M7

Bartlett-féle próba. A szórásnégyzetek homogenitására vonatkozó feltevés nem teljesülése olykor kiküszöbölhető az adatok logaritmikus transzformálásával. Ha a szórásnégyzetek heterogenitása túlságosan szélsőségesnek bizonyul, és transzformációval nem javítható, akkor célszerű megfontolni például a lefelé lépegető Jonkheere-féle trendpróba alkalmazását. Az NOEC meghatározásához további útmutatás is található a (10) hivatkozásban.

62. A legújabb kutatási eredmények alapján az az ajánlás fogalmazható meg, hogy az NOEC kiszámítása helyett célszerűbb az EC_x pontonkénti értékét becsülni regresszió alapján. Ehhez a *Myriophyllum*-vizsgálathoz még nem állapítottak meg megfelelő x értéket. A 10–20 %-os tartomány azonban megfelelőnek tűnik (a választott hatásváltozótól függően), és célszerű mind az EC_{10}-et, mind az EC_{20}-at, továbbá konfidenciahatáraikat megadni a vizsgálati jegyzőkönyvben.

Jegyzőkönyvezés

63. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosító adatok, például IUPAC- vagy CAS-név, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonossága stb. (ideértve adott esetben a szervesszén-tartalmat).

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k vagy keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonossága (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai jellemzik.

A vizsgálathoz használt fajok

— Tudományos név és eredet.

Vizsgálati körülmények

— Alkalmazott vizsgálati eljárás (statikus vagy félstatikus).

— A vizsgálat megkezdésének időpontja és időtartama.

— Vizsgálati közeg.

— A kísérleti terv ismertetése: vizsgálati edények és fedők, oldattérfogatok, fő hajtás hossza vizsgálati edényenként a vizsgálat megkezdésekor.

— Vizsgálati koncentrációk (szükség szerint névleges és mért értékek) és párhuzamosok száma koncentrációnként.

— A törzs- és a vizsgálati oldatok elkészítésének módszere, az esetleg alkalmazott oldó- vagy diszpergálószer.

— Hőmérséklet a vizsgálat folyamán.

— Fényforrás, a fény intenzitása és homogenitása.

— A vizsgálati és a kontrolloldatok pH-értékei.

— A vizsgálati vegyi anyag analizálásának módszere a megfelelő minőség-ellenőrzési adatokkal együtt (validálási vizsgálat, a szórás vagy az analízisek konfidenciahatárai).

▼M7

— A fő hajtás hosszának és más mérési változóknak, pl. az oldalágak teljes hosszának, a hajtások teljes hosszának, a gyökerek teljes hosszának, a nedves tömegnek, a száraz tömegnek vagy az örvök számának a meghatározási módszerei.

— A tenyészet állapota (steril vagy nem steril) minden egyes vizsgálati és kontrolledényben minden adatfelvétel alkalmával.

— Minden eltérés ettől a vizsgálati módszertől.

Eredmények

— Nyers adatok: fő hajtás hossza és a további mérési változók minden egyes vizsgálati és kontrolledényben minden adatfelvételkor és analízis alkalmával.

— Az egyes mérési változók átlagai és szórásai.

— Az egyes mérési változók növekedésgörbéi.

— Hatásváltozók számított értéke minden kezelt replikátumra, továbbá az átlag és a variációs koefficiens a párhuzamosok tekintetében.

— A koncentráció–hatás összefüggés grafikus formában.

— A hatásváltozók toxikus végpontjainak becsült értékei, például EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} és a hozzájuk tartozó konfidencia-intervallumok. Ha kiszámították, az LOEC, illetve az NOEC értéke, továbbá a számításukhoz alkalmazott statisztikai módszerek.

— ANOVA alkalmazása esetén a kimutatható hatás mértéke (például a legkisebb szignifikáns különbség).

— A kezelt csoportban észlelt esetleges növekedésserkentés.

— Fitotoxicitásra utaló esetleges látható jelek, valamint a vizsgálati oldatokkal kapcsolatos észrevételek.

— Az eredmények szöveges elemzése, beleértve az e vizsgálati módszertől való eltérések vizsgálat kimenetelére gyakorolt hatását.

SZAKIRODALOM

(1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

(1) Maletzki, D. *et al*. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* No. 22, pp. 702–710.

(2) E melléklet C.26. fejezete: *Lemna* sp. növekedésgátlási próba

(3) OECD (2014), „*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.

(4) OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(5) E melléklet C.51. fejezete: *Myriophyllum spicatummal* végzett víz–üledék toxicitási vizsgálat

(6) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.

▼**M7**

(7) Nyholm, N. *et al*. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(8) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.

(9) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(10) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

(11) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(12) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(13) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(14) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.

(15) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.

▼M7

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Élőanyagtömeg (biomassza): a populációban jelen lévő élő anyag nedves és/vagy száraz tömege. Ebben a vizsgálatban az élőanyagtömeg a fő hajtás, az összes oldalág és az összes gyökér összege.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Klorózis: a vizsgálathoz felhasznált szervezet, különösen az örvök színének zöldről sárgásra történő változása.

ECx: a vizsgálati közegben oldott vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely meghatározott expozíciós időszak alatt x %-os (pl. 50 %-os) csökkenést okoz a *Myriophyllum spicatum* növekedésében (ha eltér a teljes vagy szokásos vizsgálati időtartamtól, értékét külön meg kell adni). Annak egyértelmű jelzésére, hogy az EC-érték a növekedési sebesség vagy a hozam alapján került-e meghatározásra, növekedési sebesség esetén „E_rC”, hozam esetén pedig „E_yC” jelölést kell használni, majd ezt követően meg kell adni a mérési változót, például: E_rC (a fő hajtás hossza).

Növekedés: a mérési változóknak, pl. a fő hajtás hosszának, az oldalágak teljes hosszának, a hajtások teljes hosszának, a gyökerek teljes hosszának, a nedves tömegnek, a száraz tömegnek vagy az örvök számának a növekedése a vizsgálati időszakra tekintve.

Növekedési sebesség (átlagos fajlagos növekedési sebesség): a mérési változó logaritmikus növekedése az expozíciós idő alatt. *Megjegyzés*: A növekedési sebességgel összefüggő hatásváltozók függetlenek a vizsgálat időtartamától mindaddig, amíg az expozícióval nem érintett kontrollszervezetek növekedési mintázata exponenciális.

Megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC): az a legalacsonyabb vizsgált koncentráció, amely mellett adott expozíciós idő alatt a vegyi anyag statisztikailag szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) csökkenti a növekedésre kifejtett hatást a kontrolltenyészethez képest. Azonban az LOEC-szint feletti valamennyi vizsgálati koncentrációnak olyan ártalmas hatást kell kifejtenie, amely legalább egyenlő az LOEC-szinten megfigyelttel vagy súlyosabb annál. Amennyiben e két feltétel nem teljesíthető, akkor kimerítő magyarázatot kell adni arra, hogy hogyan történt az LOEC (és ennélfogva az NOEC) kiválasztása.

Mérési változók: a vizsgálat végpontjának egy vagy több különböző hatásváltozó segítségével történő kifejezése érdekében mért valamennyi változó. Ebben a vizsgálati módszerben a mérési változók a fő hajtás hossza, az oldalágak teljes hossza, a hajtások teljes hossza, a gyökerek teljes hossza, a nedves tömeg, a száraz tömeg és az örvök száma.

Monokultúra: egyetlen növényfajból álló tenyészet.

Nekrózis: a vizsgálati szervezet elhalt (például fehér vagy sötétbarna) szövete.

Megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC): az a vizsgálati koncentráció, amely közvetlenül az LOEC alatt helyezkedik el.

Hatásváltozó: a toxikus hatás becslésére használt, az élőanyagtömeg leírására szolgáló bármely mért változóból különböző számítási módszerekkel levezethető változó. Ebben a vizsgálati módszerben hatásváltozó a növekedési sebesség és a hozam, amelyeket a fő hajtás hosszából, a hajtások teljes hosszából, a nedves tömegből, a száraz tömegből vagy az örvök számából mint mérési változókból származtatnak.

Félstatikus (oldatcserés) vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek során a vizsgálati oldatot bizonyos időközönként lecserélik.

▼M7

Statikus vizsgálat: olyan vizsgálati módszer, amelynek során a vizsgálati oldatot nem cserélik le.

Vizsgálati vegyi anyag: e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

A vizsgálat végpontja: az az általános tényező, amelyre a vizsgálat irányul, és amely a vizsgálati vegyi anyag hatására a kontrolltenyészethez képest megváltozik. Ebben a vizsgálati módszerben a vizsgálat végpontja a növekedésgátlás, amely különböző, egy vagy több mérési változóból származtatott hatásváltozók segítségével fejezhető ki.

Vizsgálati közeg: az a teljes, szintetikus tápoldat, amelyben a vizsgálati növények a vizsgálati vegyi anyag jelenlétében növekednek. A vizsgálati vegyi anyag általában oldott formában van jelen a vizsgálati közegben.

UVCB-k: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

Hozam: az élőanyagtömeget leíró mérési változó értéke az expozíciós idő végén, mínusz ugyanezen változó értéke az expozíciós idő kezdetén. *Megjegyzés:* ha az expozícióval nem érintett szervezetek növekedési mintázata exponenciális, a hozam alapú hatásváltozók a vizsgálat előrehaladtával csökkennek.

▼M7

2. függelék

MÓDOSÍTOTT ANDREWS-FÉLE KÖZEG TÖRZSTENYÉSZETHEZ ÉS ELŐKULTÚRÁHOZ

A törzstenyészethez és előkultúrához szükséges módosított Andrews-féle közeget öt külön elkészített tápanyag-törzsoldatból kell elkészíteni 3 % szacharóz hozzáadásával.

1. táblázat

Az Andrews-féle tápoldat összetétele: (ASTM szerinti megjelölés: E 1913-04)

Tápanyag-törzsoldatok készítése			Tápoldatok készítése
Törzsoldat	Vegyi anyag	Kezdeti tömeg 1 000 ml-re	ml 5 l tápoldatra
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	Lásd alább a 3.1. törzsoldatot.		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	

A törzsoldatok 6 hónapig tárolhatók hűtőszekrényben (5–10 °C-on). Csak az 5. sz. törzsoldatnak kisebb az eltarthatósági ideje (két hónap).

2. táblázat

3.1. törzsoldat készítése a 3. törzsoldat előállításához

Vegyi anyag	Kezdeti tömeg 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

A 3.1. törzsoldat (2. táblázat) elkészítését követően mélyfagyasztani kell ezt az oldatot, megközelítőleg 11 ml-es alikvotokban (legalább – 18 °C-on). A mélyfagyasztott adagok öt évig tarthatók el.

A 3. törzsoldat elkészítéséhez ki kell olvasztani a 3.1. törzsoldatot, abból 10 ml-t 1 l -es mérőlombikba kell tölteni, és ultratiszta vizet kell hozzáadni a lombik jelzéséig.

A módosított Andrews-féle közeg előállításához 2 500 ml ultratiszta vizet kell tölteni egy 5 l-es mérőlombikba. Az egyes törzsoldatokból 50 ml hozzáadását követően a mérőlombikot fel kell tölteni 90 %-ra ultratiszta vízzel, a pH-t pedig 5,8-re kell beállítani.

▼M7

Ezt követően 150 g oldott szacharózt kell hozzáadni (3 % 5 l-re); majd a mérőlombikot a jelölésig fel kell tölteni ultratiszta vízzel. Végül a tápoldatot 1 l-es Schott-lombikba kell tölteni, és autoklávban 121 °C-on 20 percig kell kezelni.

Az így nyert tápoldat hűtőszekrényben (5–10 °C-on) három hónapig sterilen tartható.

Módosított Andrews-féle közeg az üledékmentes toxicitási vizsgálathoz

Az 1. és 2. táblázatban említett öt tápanyag-törzsoldatból tízszeres koncentrációjú, a vizsgálati oldathoz szükséges, módosított Andrews-féle közeg készül, 30 % szacharóz hozzáadásával. Ehhez 100 ml ultratiszta vizet kell tölteni 1 l-es mérőlombikba. Az egyes törzsoldatokból 100 ml hozzáadását követően a pH-t 5,8-ra kell beállítani. Ezt követően 30 % oldott szacharózt kell hozzáadni (300 g-ot 1 000 ml-re); majd a mérőlombikot a jelölésig fel kell tölteni ultratiszta vízzel.

Végül a tápoldatot 0,5 l-es Schott-lombikba kell tölteni, és autoklávban 121 °C-on 20 percig kell kezelni.

Az így nyert tízszeres koncentrációjú tápoldat hűtőszekrényben (5–10 °C-on) három hónapig sterilen tartható.

▼M7

3. függelék

A TÖRZSTENYÉSZETEK TARTÁSA

Ez a 3. függelék a *Myriophyllum spicatum* L ([1]), a süllőhínárok családjába tartozó, víz alatt növekedő kétszikű növény törzstenyészetét ismerteti. Június és augusztus között nem feltűnő, rózsaszín/fehér virágok törnek a vízfelszínre. A növények erős rizómarendszerrel a talajban gyökereznek, és a teljes északi féltekén megtalálhatók tápanyagban gazdag, ugyanakkor nem szennyezett és magas mésztartalmú állóvizekben, sáros táptalajban. A *Myriophyllum spicatum* az édesvizet kedveli, de brakkvízben is megél.

A laboratóriumi körülmények között használt üledékmentes törzstenyészethez steril növényekre van szükség. Steril növények beszerezhetők a német Umweltbundesamt (Németország Szövetségi Környezetvédelmi Ügynöksége) ökotoxikológiai laboratóriumából.

Vagylagosan a vizsgálati szervezetek nem steril növényekből is elkészíthetők az E 1913-04 ASTM-megjelöléssel összhangban. Lásd alább az ASTM-szabvány kivonatát, a terepről begyűjtött *Myriophyllum sibiricum* tenyésztési eljárására vonatkozóan:

„Ha a kiindulópont terepről begyűjtött, nem steril növény, a *M. sibiricum* sarjhajtásait ősszel kell begyűjteni. A sarjhajtásokat kvarchomokkal vagy pl. Turface®-szel fedett, 5 cm steril üledéket és 18 l reagens vizet tartalmazó 20 l-es akváriumba kell helyezni. Az akváriumot szellőztetni kell, továbbá 15 °C hőmérsékletet és naponta 16 órában 200–300 μmol m^{-2} s^{-1} fluxussűrűséget kell fenntartani. Az akváriumban található növénytenyészet háttérforrásként alkalmazható, ha a steril növénytenyészetek a növesztőfülke mechanikus meghibásodása vagy szennyezés miatt, illetve egyéb okból tönkremennek. Az akváriumban tenyésztett növények nem sterilek, a steril kultúrák pedig nem tarthatók megszakított tenyésztési rendszerben. A tenyészet sterilizálásához a növényeket ki kell venni az akváriumból, körülbelül fél órán keresztül ioncserélt folyóvízzel át kell öblíteni. Csíramentes környezetben, lamináris áramlású fülkében a növényeket kevesebb, mint 20 percig fertőtleníteni kell (amíg a növényszövet nagy része ki nem fehéredik és csak a rügy zöld) 3 %-os (térfogatszázalék), 0,01 % megfelelő felületaktív anyagot tartalmazó nátrium-hipoklorit oldatban. A fertőtlenítőszert és a növényi anyagot el kell keverni. A több nódusszal rendelkező szegmenseket 45 ml sterilizált, módosított Andrews-féle közeget tartalmazó steril tenyésztőcsövekbe kell áthelyezni, a csöveket egyszerű tenyésztőcső-kupakkal kell lezárni. Az egyes vizsgálati kamrákba csak egy növényi szegmens helyezhető be. A tenyésztőedény lezárását laboratóriumi tömítőfólia biztosítja. Amint a steril tenyészet elkészült, a több nóduszt tartalmazó növényi szegmenst 10–12 naponta friss, folyékony táptalajt tartalmazó új vizsgálati kamrákba kell áthelyezni. Az agarlemezen történő tenyésztésnél bemutatottak szerint a növényeknek sterilnek kell lenniük és maradniuk a vizsgálat megkezdése előtt nyolc héten át.”

Mivel a módosított Andrews-féle közeg szacharózt tartalmaz (amely kedvez a gombák és baktériumok növekedésének), valamennyi anyagot, oldatot steril körülmények között kell elkészíteni, és a tenyésztést is így kell elvégezni. Valamennyi folyadékot és berendezést a használat előtt sterilizálni kell. A sterilizációt 4 órás hőkezeléssel (210 °C) kell elvégezni, vagy autoklávval 121 °C-on 20 percig. Emellett minden lombikot, edényt, tálat stb. és egyéb eszközt lángkezelésnek kell alávetni közvetlenül a használat előtt steril munkaasztalon.

A törzstenyészetek csökkentett megvilágítás mellett alacsony hőmérsékleteken (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) hosszabb ideig újbóli elkészítés nélkül is fenntarthatók.

([1]) Carl von Linné (*1707. május 23., Råshult /Älmhult; † 1778. január 10., Uppsala).

▼M7

A *Myriophyllum* tápoldatának meg kell egyeznie a vizsgálatok során alkalmazottal, de a törzstenyészetek más, tápanyagokban gazdag közegben is tarthatók.

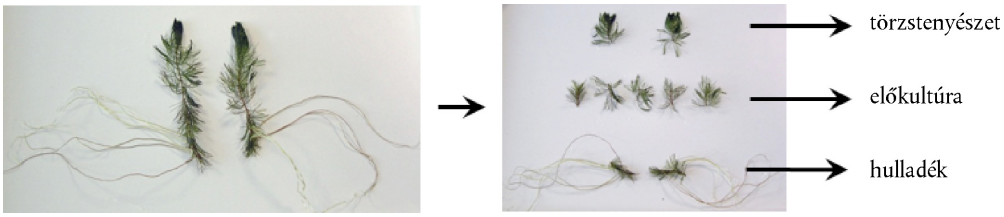
A növényi szegmenseket steril körülmények között több 500 ml-es Erlenmeyer-lombikban és/vagy 2 000 ml-es Fernbach-lombikban kell elosztani, amelyet megközelítőleg 450 ml, illetve 1 000 ml módosított Andrews-féle közeggel kell feltölteni. Ezt követően a lombikokat cellulóz dugóval steril körülmények között le kell dugaszolni.

Emellett teljes mértékben szükség van az eszközök steril munkaasztalon történő lángkezelésére közvetlenül a használat előtt. A számtól és a mérettől függően a növényeket friss tápoldatba kell áthelyezni megközelítőleg háromhetente.

E megújított tenyésztéshez a csúcs, illetve a szár középső részének szegmensei is használhatók. Az áthelyezett növények (vagy növényi szegmensek) száma és mérete attól függ, hogy mennyi növényre van szükség. Például áthelyezhető öt, 5 cm-es hajtásszegmens egy Fernbach-lombikba és három, szintén 5 cm-es hajtásszegmens egy Erlenmeyer-lombikba. A gyökeres, virágos, elhalt vagy egyébként a többitől eltérő részeket el kell dobni.

1. ábra

A növények feldarabolása a törzstenyészethez és az előkultúrához három hétig tartó tenyésztés után.



A növények tenyésztését 500 ml-es Erlenmeyer- és 2 000 ml-es Fernbach-lombikban kell elvégezni hűtött inkubátorban, 20 ± 2 °C-on megközelítőleg 100–150 µE m^{-2} s^{-1} vagy 6 000–9 000 lux megvilágítás mellett („meleg-fehér” színhőmérsékletű kamrai megvilágítással).

2. ábra

Növények tenyésztése hűtő inkubátorban kamrai megvilágítással.



Kémiailag tiszta (savval lemosott) és steril üveg tenyésztőedényeket kell alkalmazni, a kezelés során csíramentes körülményeket biztosítva. A törzstenyészet pl. algával, gombával és/vagy baktériummal történő szennyeződése esetén új tenyészetet kell készíteni, vagy más laboratóriumból származó törzstenyészetet kell használni az adott tenyészet cseréjére.

▼M7

4. függelék

AZ ELŐKULTÚRA TARTÁSA ÉS A VIZSGÁLATI SZERVEZET ELŐKÉSZÍTÉSE VIZSGÁLATRA

Az előkultúrához a törzstenyészet hajtásait két örvöt tartalmazó szegmensekre kell vágni; a szegmenseket módosított (3 % szacharózt tartalmazó) Andrews-féle közeggel feltöltött Fernbach-lombikba kell helyezni. Az egyes lombikok legfeljebb 50 hajtásszegmenst tartalmazhatnak. Gondoskodni kell ugyanakkor arról, hogy a szegmensek élő részek legyenek, ne legyen sem gyökerük, sem oldaláguk, sem bimbójuk (lásd a 3. függelék 1. ábráját).

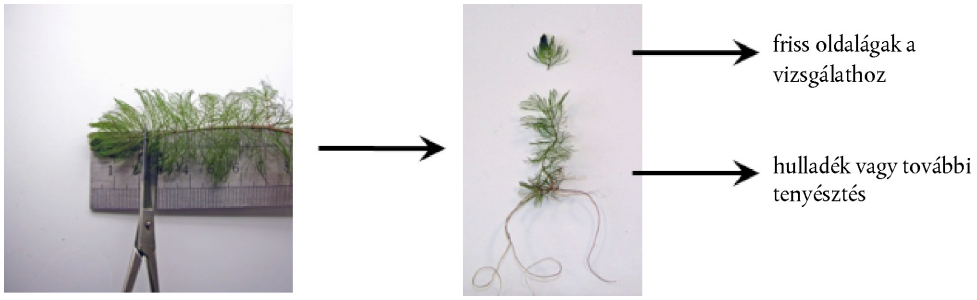
Az előkultúra szervezeteit 14–21 napon át kell tenyészteni steril körülmények között, olyan környezeti kamrában, ahol a világos/sötét fázisok 16/8 órás periódusokban váltakoznak. A fényerősséget a 100–150 μE m^{-2} s^{-1} tartományban kell megválasztani. A vizsgálati edényekben a hőmérséklet 23 ± 2 °C legyen.

Mivel a módosított Andrews-féle közeg szacharózt tartalmaz (amely kedvez az algák, a gombák és a baktériumok növekedésének), a vizsgálati vegyi anyagok oldatait steril körülmények között kell elkészíteni, és a tenyésztést is így kell elvégezni. Valamennyi folyadékot és berendezést a használat előtt sterilizálni kell. A sterilizációt 4 órás hőkezeléssel (210 °C) kell elvégezni, vagy autoklávval 121 °C-on 20 percig. Emellett minden lombikot, edényt, tálat stb. és egyéb eszközt lángkezelésnek kell alávetni közvetlenül a használat előtt steril munkaasztalon.

A hajtásokat steril körülmények között el kell távolítani az előkultúrára szolgáló lombikból, a lehető leghomogénebb anyagot választva. Az egyes vizsgálatokhoz legalább 60 vizsgálati szervezet szükséges (a vizsgálati vegyi anyag nyolc koncentrációja melletti vizsgálat esetén). A vizsgálathoz az előkultúrák friss oldalágait kell kiválasztani, azokat a tőtől 2,5 cm-re le kell vágni (ezt vonalzóval kell mérni), majd át kell helyezni steril módosított Andrews-féle közeget tartalmazó főzőpohárba. Ezeket a friss oldalágakat fel lehet használni az üledékmentes *Myriophyllum spicatummal* végzett toxicitási vizsgálathoz.

2. ábra

Az előkultúrából származó növények feldarabolása az üledékmentes *Myriophyllum spicatummal* végzett toxicitási vizsgálathoz.



▼M7

C.51. *MYRIOPHYLLUM SPICATUMMAL* VÉGZETT VÍZ–ÜLEDÉK RENDSZERŰ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 239. vizsgálati iránymutatásával (2014). Vizsgálati módszerek állnak rendelkezésre a lebegő egyszikű vízinövény, a *Lemna* fajok (1) és algafajok (2) tekintetében. E módszereket szokásosan használják a vizsgálati vegyi anyagok kockázatának kezeléséhez szükséges adatok generálására, különösen olyan vegyi anyagok esetén, amelyek gyomirtó hatást váltanak ki a nem célfajnak számító vízinövényfajokkal szemben. Ugyanakkor, egyes esetekben szükség lehet adatokra további makrofita fajok esetében is. A Környezettoxikológiai és Kémiai Társaság (SETAC) vízi makrofiták kockázatértékelése a növényvédő szerek tekintetében (AMRAP) elnevezésű munkaértekezlete által a közelmúltban közzétett útmutató arra utalt, hogy szükség lehet a vizsgálati vegyi anyagokra vonatkozó adatokra a gyökeres makrofita fajok esetében, ahol a *Lemna* és az algák ismerten nem érzékenyek a hatásmechanizmusra, vagy ahol az üledékbe történő kiválás folytán gyökéren keresztül történő felvétel útján jelentkező expozíció várható (3). A jelenlegi ismeretek és tapasztalatok alapján *Myriophyllum* fajokat választottak ki, mint előnyben részesítendő fajokat azokra az esetekre, amelyekben adatokra van szükség a víz alatti, gyökeres kétszikű fajok vonatkozásában (4) (5) (6). E vizsgálat nem helyettesíti a többi vízi toxicitási vizsgálatot; inkább ki kell egészítenie azokat, így a vízinövényeket érő veszélyek és kockázatok értékelése teljesebb képet adhat. *Myriophyllum spicatummal* végzett víz–üledék rendszerű vizsgálati módszer kiegészíti a *Myriophyllum spicatummal* végzett üledékmentes toxicitási vizsgálatot (7).

2. Ez a dokumentum olyan vizsgálati módszert mutat be, amely lehetővé teszi annak értékelését, hogy milyen hatást gyakorol a vizsgálati vegyi anyag a *Myriophyllum spicatum* gyökeres vízinövényfajra, amely víz–üledék rendszerben növekszik. Ez a vizsgálati módszer részben meglévő módszerekre épül (1) (2) (8), és figyelembe veszi a vízinövényekre vonatkozó kockázatértékelésekkel összefüggő közelmúltbeli kutatásokat (3). A víz–üledék rendszerű módszert olyan *Myriophyllum* fajokkal végzett nemzetközi, laboratóriumok közötti összehasonlítással validálták, amelyeket statikus körülmények között tenyésztettek, továbbá a vízoszlopon keresztül tettek ki a vizsgálati vegyi anyagnak (9). A vizsgálati rendszer ugyanakkor gyorsan kiigazítható úgy, hogy lehetővé tegye a vegyi anyaggal kiegészített üledék útján történő expozíciót, illetve félstatikus vagy impulzusos adagolási forgatókönyvek szerint a vizes fázis útján történő expozíciót, jóllehet e forgatókönyveket hivatalosan nem vetették alá laboratóriumok közötti összehasonlításnak. Ezenfelül az általános módszer használható más gyökeres, víz alatti és vízből kiemelkedő fajokra, köztük más *Myriophyllum* fajokra (pl. *Myriophyllum aquaticum*) vagy a *Glyceria maxima* fajra (10). Más fajok esetében szükség lehet a vizsgálati körülmények, a vizsgálati terv és időtartam módosítására. Különösen több munkára van szükség a *Myriophyllum aquaticum*ra vonatkozó megfelelő eljárások meghatározásához. Ezeket a lehetőségeket ez a vizsgálati módszer nem ismerteti részletesen, hanem a *Myriophyllum spicatum* statikus rendszerben, a vizes fázison keresztül történő expozíciójának standard megközelítését mutatja be.

3. Ez a vizsgálati módszer azon anyagokra vonatkozik, amelyek tekintetében a vizsgálati módszert validálták (a részleteket lásd a laboratóriumok közötti összehasonlításról szóló jelentésben (9)), illetve készítményekre vagy ismert keverékekre vonatkozik. A *Myriophyllum*-vizsgálatot le lehet folytatni a vizsgálati vegyi anyag üledékbe való esetleges kiválása, hatásmechanizmusa/megválasztási kérdések nyomán felmerülő első szintű adatokkal kapcsolatos igények teljesítésére. Ugyanígy, laboratóriumi *Myriophyllum*-vizsgálatra lehet szükség magasabb szintű stratégia részeként a vízinövényeket érő kockázatokkal kapcsolatos aggályok kezelésére. A vizsgálat lefolytatásának konkrét indoka határozza meg az expozíciós utat (azaz, hogy az expozíció a vízen vagy az üledéken keresztül történik-e). E vizsgálati módszernek adott keverék szabályozási célú vizsgálatára történő használata előtt mérlegelni kell, hogy e módszer megfelelő eredményeket adhat-e e cél szempontjából, és ha igen, miért. Ilyen megfontolások nem szükségesek, ha létezik a keverék vizsgálatára vonatkozó szabályozási követelmény.

▼M7

A VIZSGÁLAT ELVE

4. A vizsgálatot annak érdekében alakították ki, hogy értékelni lehessen a standardizált közegben (víz, üledék és tápanyagok) élő *Myriophyllum* növények vegetatív növekedésére gyakorolt, vegyi anyagokkal összefüggő hatásokat. Ebből a célból az egészséges, nem virágzó növények hajtáscsúcsait standardizált, mesterséges üledékbe ültetik, amelyet további tápanyagokkal egészítenek ki a növény megfelelő növekedésének garantálása érdekében, majd Smart- és Barko-féle közegben tartják (1. függelék). A gyökérképződést lehetővé tevő telepítési időszakot követően a növényeket többféle vizsgálati koncentrációnak teszik ki, amelyeket a vízoszlophoz adagolnak. Vagylagosan üledék útján történő expozíció is előidézhető a mesterséges üledék vizsgálati vegyi anyaggal történő kiegészítésével, majd a növények e kiegészített üledékbe történő áthelyezésével. A növényeket ezt követően mindkét esetben szabályozott környezeti körülmények között tartják 14 napig. A növekedésre gyakorolt hatásokat a hajtáshossz, a nedves és a száraz tömeg mennyiségi értékeléséből, valamint az olyan tünetek, mint a klorózis, a nekrózis vagy a növekedési deformitások mennyiségi szempontú megfigyeléséből határozzák meg.

5. A vegyi anyag hatásainak számszerű kifejezése érdekében a vizsgálati oldatban bekövetkező növekedést össze kell vetni a kontrollnövények növekedésével, és meg kell határozni azt az EC_x-szel kifejezett koncentrációt, amely egy adott x %-os növekedésgátlást idéz elő (az x a szabályozási követelmények függvényében bármilyen érték lehet, pl. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}). Meg kell jegyezni, hogy az EC_{10} és EC_{20} értékek csak olyan vizsgálatokban megbízhatók és megfelelők, ahol a variációs koefficiens a kontrollnövényekben elmarad a becsült hatásszinttől, azaz a variációs koefficiens < 20 % kell legyen az EC20 durva becslése esetén.

6. A kezelt és nem kezelt növények átlagos fajlagos növekedési sebességét (a hajtás hosszára, nedves tömegére és száraz tömegére vonatkozó értékelésekből származó becslés alapján) és a hozamot (amelyet a hajtás hosszának, nedves tömegének és száraz tömegének a növekedéséből kell becsülni) egyaránt meg kell határozni. A fajlagos növekedési sebességet (r) és a hozamot (y) ezt követően felhasználják az E_rC_x (pl. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}), illetve az E_yC_x (pl. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}) meghatározására.

7. Szükség esetén az átlagos fajlagos növekedési sebesség és a hozam becsléséből statisztikai eljárással meghatározható továbbá a megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC) és a megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) értéke is.

A VIZSGÁLATI VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

8. Rendelkezésre kell állnia olyan analitikai eljárásnak, amellyel a vizsgálati közegben lévő vegyi anyag mennyisége kellő pontossággal meghatározható.

9. A vizsgálati körülmények meghatározása érdekében célszerű lehet tájékozódni többek között a vizsgálati vegyi anyag szerkezeti képletéről, több összetevőből álló anyagok, UVCB-k, keverékek vagy készítmények esetén az összetételről, a vegyi anyag tisztaságáról, vízoldékonyságáról, vízben és fény hatására tanúsított stabilitásáról, sav disszociációs állandójáról (pKa) és oktanol-víz megoszlási együtthatójáról (K_{OW}), ha rendelkezésre áll, az üledék tekintetében vett K_d értékéről, gőznyomásáról és biológiai lebonthatóságáról. A vízoldékonyságból és a gőznyomásból meghatározható a Henry-állandó, amely megmutatja, mennyire valószínű, hogy a vizsgálat során a vizsgálati vegyi anyag jelentős mennyiségben eltávozik. Ha a vizsgálati vegyi anyagból valószínűsíthetően eltávozik adott mennyiség, ezt számszerűsíteni kell, és az ilyen eltávozás kontrollálására szolgáló további lépéseket dokumentálni kell. Ha a vizsgálati vegyi anyag(ok) oldhatóságára és stabilitására vonatkozó információk bizonytalanok, célszerű ezeket a vizsgálat körülményei, azaz a vizsgálatban alkalmazandó tápoldat, hőmérséklet és fényviszonyok mellett meghatározni. *Megjegyzés*: fénytől függő peroxidáló gyomirtó szerek vizsgálatakor az alkalmazott laboratóriumi megvilágításnak a természetes napfényben megtalálható ultraibolya fénnyel egyenértékű fényt kell kibocsátania.

▼M7

10. A pH-t mérni kell és adott esetben ki kell igazítani a vizsgálati közegben. Különösen fontos a vizsgálati közeg pH-értékének szabályozása, például fémek vagy könnyen hidrolizálódó vegyi anyagok vizsgálata esetén. Az OECD iránymutatása (11) további útmutatást ad olyan vegyi anyagok vizsgálatához, amelyek fizikai-kémiai tulajdonságaiknál fogva nehezen vizsgálhatók.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

11. Ahhoz, hogy a vizsgálati eredmények érvényesek legyenek, a hajtások teljes hossza átlagának és a hajtások teljes nedves tömege átlagának a kontrollnövényekben legalább meg kell kétszereződnie a vizsgálat expozíciós fázisában. Ezenfelül a kontrollnövények nem mutathatják klorózis látható jeleit, és azoknak láthatóan mentesnek kell lenniük a más szervezetek általi szennyezésektől, pl. algáktól és/vagy baktériumrétegektől a növényen, az üledék felszínén és a vizsgálati közegben.

12. A hozam variációs koefficiensének átlaga a hajtások nedves tömegének a mérése alapján (azaz a vizsgálat kezdete és vége között) a kontrolltenyészetekben nem haladhatja meg a 35 %-ot a párhuzamosok között.

REFERENCIA-VEGYIANYAG

13. A vizsgálati eljárás időbeli teljesítményének ellenőrzéseként a vizsgálatot időszakonként el kell végezni referencia-vegyianyaggal (referencia-vegyianyagokkal), például a laboratóriumok közötti összehasonlításban (9) használt 3,5-diklór-fenollal. A laboratóriumok közötti összehasonlításból származó adatok arra utalnak, hogy a 3,5-DCP EC50 átlagai a különböző hatásváltozók tekintetében 4,7 és 6,1 mg/l között voltak (az ezen értékek körüli, előrejelzett konfidencia-intervallum részletei tekintetében lásd a laboratóriumok közötti összehasonlításról szóló jelentést). Referencia-vegyianyaggal legalább évente kétszer (ha rendszertelenül végeznek vizsgálatot, akkor a végleges toxicitási vizsgálatokkal párhuzamosan) ajánlott vizsgálatot végezni. A 3,5-DCP várható EC50 értékeihez kapcsolódó útmutató megtalálható a nemzetközi laboratóriumok közötti összehasonlítás statisztikai jelentésében (9).

A MÓDSZER ISMERTETÉSE

Vizsgálati felszerelés

14. A vizsgálatot szabályozott környezeti körülmények között, azaz növesztőkamrában, növesztőhelyiségben vagy laboratóriumban kell lefolytatni, ahol szabályozni lehet a nappali világosságot, a megvilágítást és a hőmérsékletet (lásd a vizsgálati körülményekre vonatkozó 56–58. pontot). A törzstenyészeteket a vizsgálati edényektől elkülönítetten kell tárolni.

15. A vizsgálatot üvegből készült vizsgálati edények, azaz akváriumok vagy főzőpoharak felhasználásával kell lefolytatni; szokásosan (megközelítőleg 24 cm magas és 11 cm átmérőjű) 2 l-es üveg főzőpoharak használatosak. Ugyanakkor más (azaz nagyobb) edények alkalmasak lehetnek, feltéve, hogy a víz elég mély a korlátlan növekedéshez és ahhoz, hogy a növények a vizsgálat teljes időtartama alatt víz alatt legyenek.

16. (Megközelítőleg 9 cm átmérőjű, 8 cm magas és 500 ml térfogatú) műanyag vagy üveg növénytálak használhatók a növények üledékbe történő ültetésére. Vagylagosan üveg főzőpoharak használhatók, és egyes esetekben ezek előnyben részesítendők (pl. víztaszító vagy magas K_{ow} értékkel rendelkező vegyi anyagok vizsgálata esetén).

17. A növénytál/főzőpohár méretének megválasztását mérlegelni kell a vizsgálati edény és az előnyben részesített vizsgálati tervvel együtt (lásd alább). Az A. vizsgálati terv esetén (növénytálanként egy hajtás, edényenként három tállal) kisebb tálakra vagy nagyobb edényekre lehet szükség. A B. vizsgálati terv esetén (növénytálanként három hajtás, edényenként egy tállal) az említett tálaknak és edényeknek megfelelőnek kell lenniük. Mindenesetre a vízmélységnek 12 cm-rel az üledék teteje felett kell lennie, és az üledék felszínének/térfogatának vízfelszínhez/térfogathoz viszonyított arányát rögzíteni kell.

▼M7

Vizsgálati szervezet

18. Az ebben a vizsgálati módszerben leírt általános megközelítések egy sor vízinövényfaj vizsgálatára alkalmazhatók. Ugyanakkor az e vizsgálati módszerben ismertetett körülményeket a süllőhínárfaj, a *Myriophyllum spicatum* vizsgálatához igazították. Ez a faj a Haloragaceae kétszikűek családjába tartozik.

19. A *Myriophyllum spicatum* (eurázsiai süllőhínár) víz alatti, gyökérrel rendelkező faj, amely körülmények széles skáláját elviseli, és megtalálható mind az álló-, mind a folyóvizekben. A *M. spicatum* évelő növény, amely a gyökéreig elhal a tél folyamán. A növények általában szabadon virágoznak és hoznak magot, jóllehet a megtelepedés elsődleges módszere a hónaljrügyek vegetatív szaporodása vagy a természetesen vagy behatásra leváló szárrészek.

A vizsgálati szervezet tenyésztése

20. A növények beszerezhetők természetes populációkból vagy vízinövény-beszállítóktól. A növények eredetét mindkét esetben dokumentálni kell, és a fajok azonosságáról meg kell győződni. Nagyfokú gondossággal kell eljárni annak biztosítása érdekében, hogy a megfelelő fajt találják meg a *Myriophyllum spicatum* terepről való begyűjtésekor, különösen azokon a területeken, ahol az más *Myriophyllum* fajokkal hibridet alkothat. Kétség esetén ajánlott az ismert forrásból származó, ellenőrzött laboratóriumi tenyészeteket alkalmazni. E vizsgálatban nem használhatók vegyi szennyező anyagnak kitett vagy olyan terepről begyűjtött növények, amelyek szennyezettsége tudott.

21. Azokban a régiókban, ahol a *M. spicatum* nem áll azonnal rendelkezésre a téli hónapokban, a törzstenyészet hosszú távú fenntartására lehet szükség üvegházban vagy laboratóriumi körülmények között. A törzstenyészetet a vizsgálati körülményekhez hasonló feltételek mellett kell tartani, noha az irradiancia és a hőmérséklet csökkenthető annak érdekében, hogy mérsékelni lehessen a tenyészet kezelésének gyakoriságát (pl. ha egy időre nem terveznek *Myriophyllum* vizsgálatot). Ajánlott a vizsgálatban alkalmazandóknál nagyobb akváriumokat és növénytálakat használni, hogy teret biztosítsanak a burjánzáshoz. Az üledék és a vizes közeg összetételének meg kell egyeznie a vizsgálat során alkalmazandóval, jóllehet az üledék trágyázásának alternatív módszereit is el lehet fogadni (pl. kereskedelmi forgalomban kapható, lassú kibocsátású műtrágya-készítmények használata).

22. A törzsnövényeknek láthatóan mentesnek kell lenniük minden más szervezet, köztük csigák, szálas algák, gombák és rovarok, pl. a *Paraponyx stratiotata* moly petéi vagy lárvái, vagy az ormányosbogár-félék közé tartozó *Eubrychius velutus* lárvái vagy felnőtt egyedei általi szennyezéstől. A látható szennyeződés eltávolítása érdekében szükség lehet a növényanyag friss vízzel való leöblítésére. Ezenfelül törekedni kell az egysejtű algák és baktériumok általi szennyezés kialakulásának minimalizálására, jóllehet a növényanyagnak nem szükséges teljesen sterilinek lennie. A törzstenyészetet ellenőrizni kell, és szükség esetén át kell ültetni az algák és baktériumok általi szennyezés kialakulásának elkerülése érdekében. A törzstenyészet levegőztetése előnyös lehet, ha problémát jelent az algák és baktériumok általi szennyezés.

23. A növényeket mindenesetre a vizsgálatban alkalmazandóhoz hasonló, de azzal nem feltétlenül azonos körülmények között kell tenyészteni/akklimatizálni, a vizsgálatban való felhasználásukat megelőzően megfelelő ideig (azaz több mint két hétig).

24. Virágzó törzstenyészet nem használható a vizsgálatban, mivel a vegetatív növekedési sebesség általában csökken a virágzás alatt és azt követően.

▼M7

Üledék

25. E vizsgálat során az alábbi, az e melléklet C.28. vizsgálati módszerében (8) alkalmazott mesterséges üledék alapján készített üledék alkalmazása ajánlott. Az üledéket a C.28. vizsgálati módszerben leírtak szerint kell elkészíteni, kivéve a tápanyagok alábbiak szerint leírt hozzáadását:

(a) 4–5 % (száraz tömeg, 2 ± 0,5 % szerves szénnek megfelelően) tőzeg, amelynek pH-ja a lehető legközelebb esik az 5,5–6,0 értékhez; fontos, hogy por alakú, finomra őrölt (részecskeméret lehetőleg < 1 mm) és kizárólag levegőn szárított tőzeget használjanak.

(b) 20 % (száraz tömeg) kaolinagyag (lehetőleg 30 % feletti kaolinittartalommal).

(c) 75–76 % (száraz tömeg) kvarchomok (túlnyomó részben finom homok, amely részecskéinek több mint 50 %-a 50 és 200 μm közötti szemcsemérettel rendelkezik).

(d) Vizes táptalajt kell hozzáadni, oly módon, hogy a végleges üledéktétel 200 mg ammónium-kloridot és nátrium-foszfátot tartalmazzon az üledék száraz tömegének kg-jára számítva, és a végső keverék nedvességtartalma a 30–50 %-os tartományba essen.

(e) A végtermékként kapott üledékkeverék pH-jának 7,0 ± 0,5 értékre történő beállításához vegytiszta minőségű kalcium-karbonátot ($CaCO_3$) kell adni.

26. A tőzegnek, a kaolinagyagnak és a homoknak ismert forrásból kell származnia, és azt dokumentálni kell. Ha az eredet ismeretlen vagy bizonyos mértékig aggályos, ellenőrizni kell, hogy az üledék összetevőiben nem fordulnak-e elő kémiai szennyeződések (például nehézfémek, szerves klórvegyületek, szerves foszforvegyületek stb.).

27. Az üledék száraz alkotóelemeit egyenletesen el kell keverni, mielőtt a vizes tápoldatot alaposan az üledékbe kevernék. A nedves üledéket legalább két nappal a felhasználás előtt kell elkészíteni, hogy a tőzeg jól átitatódjon, és hogy ne lebegjenek víztaszító tőzegrészecskék a felszínen, amikor az üledékre ráöntik a közeget; felhasználás előtt a nedves üledéket sötét helyen kell tárolni.

28. A vizsgálathoz az üledéket megfelelő méretű tartályokba, például az üvegedényekbe beilleszthető átmérőjű növénytálakba kell helyezni (az üledék felületének legalább az edény felületének 70 %-át le kell fednie). Abban az esetben, ha a tartály alján lyukak találhatók, a tartály aljára helyezett szűrőpapír segít abban, hogy az üledék a tartályban maradjon. A tálakat oly módon kell megtölteni az üledékkel, hogy az üledék felülete egyenletes legyen, mielőtt azt vékony rétegben (~ 2–3 mm) befednék semleges anyaggal, például homokkal, vagy kertészeti aprókaviccsal (vagy zúzott korallal), ami a helyén tartja az üledéket.

Vizsgálati közeg

29. Smart- és Barko-féle közeg (12) ajánlott *Myriophyllum spicatum* tenyésztésére és vizsgálatára. E közegek elkészítését az 1. függelék ismerteti. A közegek pH-ja (vizes fázis) a vizsgálat kezdetén 7,5–8,0 között kell, hogy legyen a növények optimális növekedéséhez.

Kísérleti terv

30. A vizsgálatot legalább hat párhuzamos vizsgálati edényen kell elvégezni a nem kezelt kontroll, és legalább négy párhuzamos edényen az öt koncentrációszint mindegyike tekintetében.

31. Ha nem kell meghatározni az NOEC értékét, a vizsgálati terv módosítható oly módon, hogy több koncentrációt, de koncentrációnként kevesebb párhuzamost tartalmazzon.

▼M7

32. Az egyes vizsgálati edények három hajtást tartalmazó párhuzamost jelentenek. Az egyes vizsgálati edényekben kétféleképpen lehet három hajtást nevelni:

— Az A. vizsgálati terv esetén növénytálanként egy hajtás, edényenként három tállal.

— A B. vizsgálati terv esetén növénytálanként három hajtás, edényenként egy tállal.

— Alternatív vizsgálati terv (növénytálanként egy hajtás és edényenként egy tál) is elfogadható, feltéve hogy a párhuzamosokat az előírt érvényességi kritérium teljesítéséhez szükséges módon kiigazítják.

33. Az egyes vizsgálati edényeket véletlenszerűen kell a kezelt csoportokba osztani. A vizsgálat helyén a vizsgálati edényeket véletlenszerű elrendezésben kell elhelyezni annak érdekében, hogy a fényerősség és a hőmérséklet térbeli változatossága minél kisebb hatást gyakoroljon a vizsgálatokra.

A vizsgálati vegyi anyag koncentrációi és kontrollcsoportok

34. A koncentrációknak szokásosan mértani sort kell alkotniuk, ahol a vizsgálati koncentrációk közötti szorzótényező nem haladhatja meg a 3,2-t. A vizsgálati vegyi anyag toxikus hatásának előzetes ismerete, amely származhat dózisbehatároló vizsgálatból, segít a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásában.

35. Az EC_x meghatározásához a megfelelő konfidenciaszint biztosítása érdekében a vizsgálati koncentrációknak közre kell fogniuk az ECx értéket. Az EC_{50} érték becslésekor például a legmagasabb vizsgálati koncentrációnak nagyobbnak kell lennie az EC_{50} értéknél. Ha az EC_{50} érték kívül esik a vizsgálati koncentrációk tartományán, akkor a kiadódó konfidencia-intervallumok tágak lesznek, és előfordulhat, hogy nem végezhető el a modell statisztikai illeszkedésének megfelelő értékelése. Több vizsgálati koncentráció alkalmazása javítja a kapott EC_x érték körüli konfidencia-intervallumot.

36. LOEC és/vagy NOEC (opcionális végpont) meghatározása esetén a legalacsonyabb vizsgálati koncentráció legyen elegendően alacsony ahhoz, hogy a növekedés ne különbözzön jelentősen a kontrollcsoportétól. Emellett a legmagasabb vizsgálati koncentráció legyen elegendően nagy ahhoz, hogy a növekedés jelentősen kisebb legyen, mint a kontrollcsoportban. Több párhuzamos alkalmazása javítja a megfigyelhető hatást nem okozó koncentráción alapuló/ANOVA-t alkalmazó terv statisztikai erejét.

Határérték-vizsgálat

37. Azokban az esetekben, ahol a dózisbehatároló vizsgálatok azt jelzik, hogy a vizsgálati vegyi anyag 100 mg/l koncentrációig vagy az adott vizsgálati közegben való oldhatósági határig, illetőleg készítmény esetén a diszpergálóképesség határáig nem okoz káros hatást, akkor egy kontrollcsoport és egyetlen (100 mg/l koncentrációnak vagy az adott vizsgálati oldatban való oldhatósági határhoz tartozó koncentrációnak, vagy a száraz üledékben 1000 mg/kg koncentrációnak megfelelő) kezelt csoport válaszai összehasonlításának megkönnyítése érdekében határérték-vizsgálat végezhető. Ennek a vizsgálatnak egy standard dózisbehatároló vizsgálat általános elveit kell követnie, azzal a kivétellel, hogy tanácsos a párhuzamosok minimális számát hat vizsgálati edényre növelni kontroll- és koncentrációnak kitett csoportonként. A kontrollcsoportban és a kezelt csoportban tapasztalt növekedés olyan statisztikai próbával (például a Student-féle t-próbával) elemezhető, amely az átlagok összehasonlításán alapul.

Vizsgálati oldatok

38. A vizsgálati oldatokat szokásosan a törzsoldat hígításával készítik el, amelyhez a vizsgálati vegyi anyagot ásványmentesített (azaz desztillált vagy ioncserélt) víz felhasználásával Smart- és Barko-féle közegben kell feloldani vagy diszpergálni (lásd az 1. függeléket).

▼M7

39. A legmagasabb vizsgálati koncentráció általában ne haladja meg a vizsgálati vegyi anyag vizsgálati körülmények között érvényesülő vízoldékonyságát, vagy készítmények esetén a diszpergálóképességét.

40. Vízben kis mértékben oldódó vizsgálati vegyi anyag esetén szükséges lehet szerves oldó- vagy diszpergálószer alkalmazásával nagy koncentrációjú törzsoldatot vagy -diszperziót készíteni annak érdekében, hogy könnyebb legyen a vizsgálati vegyi anyagból a pontos mennyiséget a vizsgálati közegbe adagolni, és könnyebben végbemenjen a diszperzióképződés és az oldódás. Ilyen oldószerek vagy diszpergálószerek alkalmazását lehetőség szerint kerülni kell. A segédoldószer vagy -diszpergálószer alkalmazása nem járhat fitotoxikus hatással. A széles körben alkalmazott oldószerek közül például az aceton vagy a dimetil-formamid 100 μl/l koncentrációig nem okoz fitotoxikus hatást. Az esetleg alkalmazott oldó- vagy diszpergálószer végső koncentrációja – amelyet a dokumentálni kell – a lehető legalacsonyabb kell, hogy legyen (≤100 μl/l). Ilyen esetekben az oldó- vagy diszpergálószert a kezelt és a(z oldószeres) kontroll esetében azonos koncentrációban kell alkalmazni. A vizsgálati terv ki kell terjedjen olyan nem kezelt kontroll párhuzamosokra is, amelyek nem tartalmaznak oldószert vagy diszepergálószert. Az OECD-iránymutatás (11) bővebb útmutatást ad a diszpergálószerekre vonatkozóan.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

41. A vizsgálati eljárást a vizsgálati vegyi anyag alkalmazási útja határozza meg (azaz, hogy az alkalmazásra a vizes vagy az üledékes fázisban kerül-e sor). A vizsgálati vegyi anyag víz–üledék rendszerbeli viselkedését meg kell fontolni a vizsgálatban alkalmazandó expozíciós rendszer megalapozott megválasztásának érdekében (statikus vagy statikus oldatcserés, vizsgálati vegyi anyaggal kiegészített víz vagy üledék). A vizsgálati vegyi anyaggal kiegészített üledéken alapuló vizsgálat előnyben részesítendő bizonyos esetekben olyan vegyi anyagoknál, amelyek előreláthatóan jelentősen válnának ki az üledékbe.

Telepítési fázis

42. A tenyésztett növényekről egészséges hajtáscsúcsokat, azaz oldalhajtások nélkül, kell levágni nagyjából 6 cm (± 1 cm) hajtáshosszig. Az A. vizsgálati terv esetén (növénytálanként egy hajtás, edényenként három tállal) az egyes hajtáscsúcsokat egyenként ültetik a tálba. A B. vizsgálati terv esetén (növénytálanként három hajtás, edényenként egy tállal) az üledéket tartalmazó tálakba négy–öt hajtáscsúcsot ültetnek.

43. Mindkét esetben több tálat kell beültetni, hogy a vizsgálat kezdetén egységes növényeket lehessen választani, és hogy legyenek tartalék növények, amelyeket fel lehet használni a gyökérnövekedés közvetlenül a vizsgálat előtt történő megfigyelésére, továbbá a hajtás élőanyag-tömegének és hosszának a 0. napon történő megmérésére.

44. A hajtásokat úgy kell behelyezni, hogy megközelítőleg 3 cm, amely legalább két nóduszt jelent, az üledék felszíne alatt legyen.

45. A növénytálakat ezt követően át kell helyezni a vizsgálati edényekbe, ugyanolyan körülmények közé, mint az expozíciós fázisban, és azokat hét napig ott kell tartani Smart- és Barko-féle közegben a gyökérfejlődés beindítására.

46. Ezt követően a tartalék tálakban található több növényt ki kell venni a gyökérnövekedés vizsgálata érdekében. Ha gyökérnövekedés nem tapasztalható (azaz, ha a gyökércsúcsok nem láthatók), a telepítési fázist ki kell terjeszteni, amíg a gyökérnövekedés látható nem lesz. Ez a lépés ajánlott annak biztosítása érdekében, hogy a növények aktívan növekedjenek a vizsgálat megkezdése idején.

▼M7

Egységes növényanyag megválasztása

47. Az A. vizsgálati terv esetén (növénytálanként egy hajtás, edényenként három tállal) a vizsgálat megkezdése előtt a tálakat egységességükre tekintettel választják ki. A B. vizsgálati terv esetén (növénytálanként három hajtás, edényenként egy tállal) a felesleges növényeket eltávolítják, és három növényt hagynak meg, amelyek méretre és megjelenésre egységesek.

Vizes fázisú expozíció

48. Az egységességre tekintettel kiválasztott tálakat a vizsgálati edényekbe helyezik, amint azt a kísérleti terv előírja. Ekkor a vizsgálati edényekbe Smart- és Barko-féle közeget kell tölteni. Gondosan kerülni kell az üledék felkavarását. Ebből a célból a közeget be lehet adni tölcsér felhasználásával, vagy műanyag lemezzel le lehet fedni az üledéket, amíg a közeget beleöntik a vizsgálati edényekbe, feltéve, hogy a lemezt közvetlenül ez után eltávolítják. Vagylagosan a növénytálak behelyezhetők a vizsgálati edényekbe a közeg hozzáadását követően is. Mindkét esetben friss közeg használható az expozíciós fázis kezdetén, ha szükséges az alga- és baktériumképződés minimalizálása érdekében, vagy annak lehetővé tételére, hogy a párhuzamosokhoz külön adagokban készítsék el a vizsgálati oldatot.

49. Az üledék feletti hajtáshosszt vagy a közeg beadása előtt vagy az után kell megmérni.

50. A vizsgálati vegyi anyag megfelelő mennyiségei azelőtt hozzáadhatók a vizsgálati közeghez, mielőtt azt a vizsgálati edényekbe töltenék. Vagylagosan a vizsgálati vegyi anyag azután is hozzáadható a vizsgálati közeghez, miután azt a vizsgálati edényekbe töltötték. Ebben az esetben ügyelni kell annak biztosítására, hogy a vizsgálati vegyi anyag egyenletesen oszoljon el a vizsgálati rendszerben, és kerülni kell az üledék felkavarását.

51. A vizsgálati közeg megjelenését (pl. tiszta, zavaros stb.) minden esetben fel kell jegyezni a vizsgálat kezdetén.

Üledék útján végzett expozíció

52. A kiválasztott koncentrációjú, vegyi anyaggal kiegészített üledéket rendszerint a vizsgálati vegyi anyag oldatának közvetlenül a friss üledékhez történő hozzáadásával készítik el. Az ioncserélt vízben feloldott vizsgálati vegyi anyag törzsoldatát őrlőmalommal, tápkeverővel vagy kézi keveréssel kell elkeverni az elkészített üledékkel. Ha a vizsgálati vegyi anyag csekély mértékben vízoldékony, a lehető legkisebb mennyiségű alkalmas szerves oldószerben (pl. hexán, aceton vagy kloroform) is feloldható. Ezt az oldatot ezt követően egy vizsgálati edényre számítva körülbelül 10 g finom kvarchomokkal kell elkeverni. Az oldószert hagyni kell elpárologni, ezt követően a homokot megfelelő mennyiségű üledékkel kell elkeverni vizsgálati főzőpoharanként. Csak könnyen illékony szerek használhatók fel a vizsgálati vegyi anyag szolubilizálására, diszpergálására vagy emulgeálására. Szem előtt kell tartani, hogy a vizsgálati vegyi anyaggal kiegészített homok tömegét/térfogatát figyelembe kell venni az üledék végleges elkészítésekor (azaz így az üledéket kevesebb homokkal kell elkészíteni). Gondoskodni kell annak biztosításáról, hogy a vizsgálati vegyi anyag teljesen és egyenletesen eloszoljon az üledékben.

53. A vizsgálati vegyi anyaggal kiegészített üledéket be kell tölteni a növénytálakba (a fent leírtak szerint). Az egységességre és megfelelő gyökérrendszerre tekintettel kiválasztott növényeket ki kell venni a telepítési fázisban használt tálakból és át kell ültetni a vegyi anyaggal kiegészített üledékbe, a fent leírtak szerint.

54. A tálakat a vizsgálati edényekbe kell helyezni, amint azt a kísérleti terv előírja. A Smart- és a Barko-féle közeget ezt követően – az üledék felkavarásának elkerülése érdekében – óvatosan (azaz tölcsérrel) kell hozzáadni. Az üledék feletti hajtáshosszt vagy a közegek beadása előtt, vagy az után kell megmérni.

▼M7

A vízszint fenntartása a vizsgálat alatt

55. A végleges vízszintet rögzíteni kell, és azt minden edényen meg kell jelölni. Ha a víz több mint 10 %-a elpárolog a vizsgálat során, a vízszintet desztillált vízzel kell kiigazítani. Szükség esetén a főzőlombikokat lazán le lehet fedni átlátszó fedővel, például átlátszó műanyag fedővel, hogy minimálisra mérsékeljék a párolgást és az algaspórákkal való szennyezést.

Vizsgálati körülmények

56. Meleg- és/vagy hidegfehér fluoreszkáló megvilágítást kell alkalmazni oly módon, hogy a fotoszintetikusan aktív sugárzásban (400–700 nm), a víz felszínén mért irradiancia 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2}$ s^{-1} legyen; a fény/sötét ciklusnak pedig 16/8 órásnak kell lennie. A választott irradiancia eltérései a vizsgálati területen nem haladhatják meg a ± 15 %-ot.

57. A vizsgálati edényekben a hőmérséklet 20 ± 2 °C legyen.

58. A vizsgálat során a kontrolltenyészet közegének pH-értéke nem növekedhet 1,5-nél nagyobb mértékben. Az 1,5-nél nagyobb eltérés ugyanakkor nem teszi érvénytelenné a vizsgálatot, ha igazolható, hogy a korábban meghatározott érvényességi feltételek teljesülnek.

A vizsgálat időtartama

59. Az expozíció időtartama 14 nap.

Mérések és analitikai meghatározások

60. A telepítési fázist követően és közvetlenül a kezelés előtt (azaz a 0. napon) a tálankénti három növénnyel jellemzett terv esetén öt, a tálankénti egy növénnyel jellemzett terv esetén 15 véletlenszerűen kiválasztott tálból származó tartaléknövényt vesznek ki a hajtáshossz, továbbá a nedves és száraz tömeg mérésére az alább leírtak szerint.

61. Az expozíciós fázisba áthelyezett növények esetében az 1. táblázatban bemutatott következő értékeléseket végzik el:

— A fő hajtás hosszát, az oldalhajtások számát és hosszát legalább az expozíciós fázis végén (pl. a 14. napon) meghatározzák és rögzítik.

— A növények egészségének vizuális értékelését legalább háromszor rögzíteni kell az expozíciós időszakban (pl. a 0., 7. és 14. napon).

— A hajtások nedves és száraz tömegét legalább az expozíciós fázis végén (pl. a 14. napon) meghatározzák és rögzítik.

62. A hajtás hosszát vonalzóval kell megmérni. Ha oldalhajtások is vannak, számukat és hosszukat is meg kell állapítani.

63. A növények egészségének vizuális értékelése során rögzítik a növények megjelenését és a vizsgálati közeg általános állapotát. A feljegyezendő észrevételek a következők:

— Nekrózis, klorózis vagy más elszíneződés, például a kontrollnövényekhez viszonyított túlzott pirosodás.

— Bakteriális vagy algafertőzés kialakulása;

— Növekedési rendellenességek, például satnyulás, megváltozott nóduszok közötti távolság, torz hajtások/levelek, oldalhajtások elburjánzása, levélhullás, a normális szövetrugalmasság elvesztése és a szár töredezése.

▼M7

— A gyökerek egészségének vizuális értékelésére a vizsgálat végén kerül sor, ennek alkalmával alaposan le kell mosni a gyökerekről az üledéket, hogy lehetővé váljon a gyökérrendszer megfigyelése. A kontrollnövényekhez viszonyított értékelés ajánlott lépései az alábbiakban láthatók:

1) hiányzó gyökerek

2) kevés gyökér

3) csekély mértékű gyökérfejlődés

4) kiváló gyökérfejlődés, a kontrollokéhoz hasonlóan

64. A nedves tömeget a vizsgálat kezdetekor és végén kell meghatározni úgy, hogy levágják a hajtást az üledék szintjén, majd a tömeg mérése előtt szárazra itatják. Vigyázni kell arra, hogy az üledék részecskéi ne tapadjanak a hajtás aljához. A hajtásanyagot ezt követően nagyjából 60 °C-ra beállított szárító sütőbe helyezik, és állandó tömegűre szárítják a tömeg újbóli megmérése előtt, majd a száraz tömeget rögzítik.

65. A vizsgálat ideje alatt előírt minimális biológiai értékeléseket az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat

Értékelési ütemterv

A kezelést követő nap (k.k.n.)	*Myriophyllum spicatum*			
	A hajtás hossza, az oldalhajtások hossza és száma	A hajtások vizuális értékelése	A hajtások nedves és száraz tömege A gyökerek vizuális értékelése	pH O_2
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: arra utal, hogy ezen alkalmakkor értékelésre van szükség
—: arra utal, hogy nincs szükség mérésekre

A mérések és az analitikai meghatározások gyakorisága

66. A növesztőkamrában, az inkubátorban vagy a vizsgálati helyiségben azonos körülmények között tartott további edényben legalább naponta (vagy adatgyűjtő egységgel folyamatosan) mérni kell a közeg hőmérsékletét.

67. A vizsgálati közeg pH-ját és oldottoxigén-koncentrációját a vizsgálat kezdetén, legalább egyszer a vizsgálat során és a vizsgálat végén valamennyi párhuzamos edényben mérni kell. Az egyes alkalmakkor a méréseket a nap ugyanazon időpontjában kell végezni. Ha az egyes vizsgálati koncentrációk valamennyi párhuzamosának elkészítéséhez egyetlen, nagy tételben készített oldatot használnak, akkor elfogadható, hogy a 0. napon csak ezt az oldatot mérjék.

68. Az irradianciát a növesztőkamrában, az inkubátorban vagy a vizsgálati helyiségben a vízfelszín szintjével megegyező távolságban elhelyezkedő pontokban kell mérni. A méréseket a vizsgálat kezdetén vagy a vizsgálat során legalább egyszer kell mérni. A fényerősség érzékelésére és mérésére szolgáló módszer, különösen pedig a fényérzékelő befolyásolja a mért értéket. A gömbérzékelők (amelyek a mérési sík alatt és felett tetszőleges irányból érkező fény mérésére alkalmasak) és a „koszinuszos” érzékelők (amelyek csak a mérési sík felett tetszőleges irányból érkező fény mérésére

▼M7

alkalmasak) előnyben részesítendők az egytengelyű érzékelőkkel szemben, mert az e módszerben előírt többpontos fényforrás esetén nagyobb értékeket szolgáltatnak.

A vizsgálati vegyi anyag analitikai mérései

69. A vizsgálati vegyi anyag helyes alkalmazását a vizsgálati vegyi anyag koncentrációinak analitikai méréseivel kell alátámasztani.

70. Valamennyi vizsgálati koncentráció tekintetében vízmintákat kell gyűjteni a vizsgálati vegyi anyag analizálásához röviddel a vizsgálat megkezdését követően (azaz a stabil vizsgálati vegyi anyagok esetén azok alkalmazásának napján vagy nem stabil vizsgálati vegyi anyagok esetén az alkalmazást követő egy órával) és a vizsgálat végén.

71. Az üledékben és az üledék pórusvizében lévő koncentrációt a vizsgálat kezdetén és végén meg kell határozni, legalább a legmagasabb vizsgálati koncentrációnál, kivéve, ha a vizsgálati vegyi anyag ismerten stabil a vízben (> a névleges 80 %-ánál). Az üledékre és a pórusvízre vonatkozó mérések nem feltétlenül szükségesek abban az esetben, ha a vizsgálati vegyi anyag megoszlása a víz és az üledék között egyértelműen meghatározható egy – például az üledék vízhez viszonyított aránya, az alkalmazás típusa, az üledék típusa tekintetében – összehasonlítható körülmények között végzett víz/üledék vizsgálat segítségével.

72. Az üledék vizsgálat kezdetekori mintavételezése valószínűleg megzavarja a vizsgálati rendszert. Így további kezelt vizsgálati edényre lehet szükség a vizsgálat kezdetekori és végi analitikai meghatározások megkönnyítése érdekében. Hasonlóképpen, ha a vizsgálat közben is szükségesnek tekintenek értékeléseket (például a 7. napon), és az analízishez nagy üledékminták szükségesek, amelyek nem gyűjthetők be könnyen a vizsgálati rendszerből, az analitikai meghatározásokat a biológiai értékelésekhez alkalmazottal azonos kezelésnek alávetett külön vizsgálati edények használatával kell elvégezni.

73. A szemcseközi víz izolálásához például 10 000 g intenzitással történő centrifugálás javasolt 4 °C-on 30 percig. Amennyiben azonban bizonyított, hogy a vizsgálati vegyi anyag nem adszorbeálódik a szűrőre, a szűrés is elfogadható lehet. Ha a minta mérete túl kicsi, akkor előfordulhat, hogy nem analizálható a koncentráció a pórusvízben.

74. Félstatikus vizsgálat esetén (azaz a vizes fázisú expozíció során), ha a vizsgálati vegyi anyag(ok) koncentrációja várhatóan nem marad a névleges koncentráció 20 %-os tartományában a vizsgálat ideje alatt a vizsgálati oldat cseréje nélkül, akkor minden használt és friss vizsgálati oldatot minden csere alkalmával mintavételezni kell a vizsgálati vegyi anyag koncentrációjának analizálása érdekében.

75. Olyan vizsgálatok esetén, amelyekben a vizsgálati vegyi anyag mért kezdeti koncentrációja ugyan nem a névleges koncentráció ± 20 %-os tartományában van, de kellően bizonyítható, hogy a kezdeti koncentrációk megismételhetők és stabilak (azaz a kezdeti koncentráció 80–120 %-os tartományában vannak), akkor a kémiai meghatározásokat elegendő csak a legalacsonyabb és a legmagasabb vizsgálati koncentráción elvégezni.

76. Mindegyik esetben a vizsgálati vegyi anyag koncentrációjának a meghatározását minden egyes vizsgálati koncentráció egyetlen párhuzamos edényén kell elvégezni. Vagylagosan az egyes vizsgálati koncentrációk valamennyi párhuzamosának vizsgálati oldata összevonható analizálásra.

77. Ha bizonyított, hogy a vizsgálati vegyi anyag koncentrációja a névleges koncentráció vagy a mért kezdeti koncentráció 20 %-án belül marad a vizsgálat során, akkor az eredmények értékelése és a végpontok ezt követő származtatása alapulhat a névleges értéken vagy a mért kezdeti értéken.

▼M7

78. Ezen esetekben a hatásos koncentrációknak a vizsgálat kezdetekori névleges vagy mért vízkoncentrációkon kel alapulniuk.

79. Ugyanakkor, ha bizonyított, hogy a koncentráció csökkent (azaz nem maradt meg a névleges vagy a mért kezdeti koncentráció 20 %-án belül a kezelt kamrában) a vizsgálat alatt, akkor az eredményeket az expozíció idején érvényes koncentrációértékek mértani középértéke vagy a vizsgálati vegyi anyag koncentrációjának a kezelt kamrában történő csökkenését leíró modellek alapján kell elemezni (11).

AZ ADATOK ÉRTÉKELÉSE

80. Ha oldószer/diszpergálószer alkalmazására van szükség, az oldószeres és a nem kezelt kontrollból származó adatok összevonhatók a statisztikai elemzés céljaira, feltéve, hogy az oldószeres és a nem kezelt kontroll válaszai statisztikailag szignifikánsan nem térnek el.

Hatásváltozók

81. A vizsgálat célja annak meghatározása, milyen hatást gyakorol a vizsgálati vegyi anyag a vizsgálati fajok vegetatív növekedésére; ehhez az alábbiak szerint két hatásváltozót használnak, amelyek az átlagos fajlagos növekedési sebesség és a hozam:

Átlagos fajlagos növekedési sebesség

82. Ez a hatásváltozó a hajtások teljes hosszának, a hajtások teljes nedves tömegének és a hajtások teljes száraz tömegének logaritmusai kontrollokban és egyes kezelt csoportokban bekövetkezett időbeli változásain alapul. Ezt a változót az egyes kontroll- és kezelt csoportok minden párhuzamosára ki kell számítani. A vizsgálati edényenkénti (párhuzamosonkénti) három növény hosszának és tömegének átlagát, majd az egyes párhuzamosokra jellemző növekedési sebességet az alábbi képlettel kell kiszámítani:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

ahol:

μ_{i-j}: az átlagos fajlagos növekedési sebesség az „i”-től a „j” időpillanatig

N_i: a mérési változó értéke a vizsgálati vagy a kontrolledényben az „i” időpillanatban

N_j: a mérési változó értéke a vizsgálati vagy a kontrolledényben a „j” időpillanatban

t: az „i”-től „j”-ig terjedő időtartam.

83. A párhuzamosok válaszaiból ki kell számítani a növekedési sebesség átlagértékét, valamint a szórásnégyzet becsléseit minden egyes kezelt és kontrollcsoport tekintetében.

84. Az átlagos fajlagos növekedési sebességet a vizsgálat teljes időtartamára kell meghatározni (tehát úgy, hogy a fenti összefüggésben „i” a vizsgálat kezdetét, „j” a vizsgálat végét jelöli). Minden egyes vizsgálati koncentrációra és kontrollcsoportra meg kell határozni az átlagos fajlagos növekedési sebesség átlagát, és meg kell becsülni a szórásnégyzetet.

▼M7

85. A növekedési sebesség százalékos gátlását (I_r) ezután vizsgálati koncentrációnként (kezelt csoportonként) a következő összefüggésből kell meghatározni:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

ahol:

% Ir: az átlagos fajlagos növekedési sebesség százalékos gátlása

μC: a μ átlaga a kontrollban

μT: a μ átlaga a kezelt csoportban

Hozam

86. Ez a hatásváltozó a hajtások teljes hosszának, a hajtások teljes nedves tömegének és a hajtások teljes száraz tömegének kontrollokban és egyes kezelt csoportokban bekövetkezett időbeli változásain alapul. Az átlagos százalékos hozamgátlás (% Iy) kezelt csoportonként a következő összefüggésből határozható meg:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

ahol:

% I_y: a hozam százalékos csökkenése

b_C: az élőanyag-tömeg végső értéke és kiindulási értéke közötti különbség a kontrollcsoportban

b_T: az élőanyag-tömeg végső értéke és kiindulási értéke közötti különbség a kezelt csoportban.

A koncentráció–hatás görbék elkészítése

87. El kell készíteni a hatásváltozóhoz tartozó átlagos százalékos gátlás értékét (a fentiek szerint számított I_r, vagy I_y értéket) a vizsgálati koncentráció logaritmusa függvényében ábrázoló koncentráció–hatás görbéket.

EC_x becslése

88. Az EC_x (pl. EC_{50}) becslését mind az átlagos fajlagos növekedési sebesség (E_rC_x), mind a hozam (E_yC_x) alapján el kell végezni, amelyeket viszont a hajtások teljes hosszából, teljes száraz tömegéből és teljes nedves tömegéből kell kiszámítani.

89. Megjegyzendő, hogy az e két hatásváltozó alapján számított EC_x értékek nem hasonlíthatók egymáshoz, és a vizsgálatok eredményeinek felhasználása során erre a különbségre tekintettel kell lenni. Az e vizsgálati módszerben előírt vizsgálati körülmények betartása mellett a két számítási eljárás matematikai háttere következtében az átlagos fajlagos növekedési sebességen alapuló EC_x értékek (E_rC_x) általában nagyobbra adódnak, mint a hozamon alapuló EC_x értékek (E_yC_x). Ezt az eltérést nem szabad úgy értelmezni, hogy egyik hatásváltozó érzékenyebb lenne a másiknál; egyszerűen arról van szó, hogy a két érték matematikailag mást jelent.

Statisztikai eljárások

90. A statisztikai számítások célja, hogy regresszióanalízissel kvantitatív koncentráció–hatás összefüggést állítsanak elő. Alkalmazható súlyozott lineáris regresszió, a hatásadatok például probit-, logit- vagy Weibull-egységekbe történő lineáris transzformációja után (13), de célszerű előnyben részesíteni a nem lineáris regressziós technikákat, amelyek jobban kezelik az elkerülhetetlen adatszabálytalanságokat és az egyenletes eloszlástól való eltéréseket. Akár a nulla gátlás, akár a teljes gátlás közelében a transzformáció megsokszorozhat bizonyos szabálytalanságokat, ami hibás elemzést eredményezhet

▼M7

(13). Megjegyzendő, hogy a probit-, logit- vagy Weibull-transzformáltat alkalmazó szokásos számítási módszerek elsősorban kvantált (például mortalitás kontra túlélés) adatok feldolgozására alkalmasak, így módosítást igényelnek, ha a növekedési sebességre vagy a hozamra kívánják azokat alkalmazni. Az EC_x-értékek folytonos adatokból való számítására alkalmas módszerek a (14), (15) (16) és (17) irodalomban találhatók.

91. Az egyes hatásváltozók elemzéséhez a koncentráció–válasz összefüggésből ki kell számítani az EC_x egyes pontokban becsült értékét. Az egyes becslések 95 %-os konfidenciahatárait és a hatásadatok regressziós modellhez történő megfelelő illeszkedését (goodness of fit) grafikus vagy statisztikai módszerrel kell értékelni. A regresszióanalízist az egyes párhuzamosokon nyert hatásokkal, nem pedig a kezelt csoportok átlagaival kell elvégezni.

92. Az EC_{50} becsült értékeit és a konfidenciahatárokat bootstrap módszerrel együtt alkalmazott lineáris interpolációval (18) is meg lehet kapni, ha a rendelkezésre álló regressziós modellek/módszerek nem használhatók a kapott adatokkal.

93. Az LOEC, és így az NOEC becsült értékének előállítása érdekében varianciaanalízis (ANOVA) segítségével össze kell vetni az egyes kezelésekhez tartozó átlagokat. Az egyes koncentrációkhoz tartozó átlagokat ezután alkalmasan megválasztott vizsgálati módszerrel (pl. Dunnett vagy Williams-féle próbával) a kontrollcsoporton nyert átlagokhoz kell hasonlítani (19) (20) (21) (22). Ellenőrizni kell, hogy fennáll-e az ANOVA-nak a normális eloszlásra (ND) és a szórásnégyzetek homogenitására (VH) vonatkozó feltevése. Ez a Shapiro–Wilks-féle (ND) vagy Levene-féle (VH) próbával értékelendő. A normális eloszlásra és a szórásnégyzetek homogenitására vonatkozó feltevés nemteljesülése időnként kiküszöbölhető az adatok logaritmikus transzformálásával. Ha a szórásnégyzetek heterogenitása és/vagy a normális eloszlástól való eltérés szélsőségesnek bizonyul, és transzformációval nem javítható, akkor célszerű megfontolni például a Bonferroni-Welch-t-próba, a lefelé lépegető Jonkheere-féle trendpróba és a Bonferroni-féle medián próba alkalmazását. Az NOEC meghatározásához további útmutatás is található a (16) irodalomban.

JELENTÉSTÉTEL

94. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosítás, például IUPAC- vagy CAS-név, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet, tisztaság, adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonossága stb.

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonossága (lásd fent), mennyiségi előfordulása és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai jellemzik.

A vizsgálathoz használt fajok

— tudományos név és eredet.

Vizsgálati körülmények

— a telepítési fázis időtartama;

— az alkalmazott vizsgálati eljárás (statikus, félstatikus vagy impulzusos;

▼M7

— a vizsgálat megkezdésének időpontja és időtartama;

— a vizsgálati közeg, azaz üledék és folyékony táptalaj;

— a kísérleti terv ismertetése: növesztőkamra/helyiség vagy laboratórium, vizsgálati edények és fedők, oldattérfogatok, a vizsgálati növények hossza és tömege vizsgálati edényenként a vizsgálat megkezdésekor, az üledék felületének és a víz felületének a hányadosa, az üledék és a víz térfogatának hányadosa;

— vizsgálati koncentrációk (szükség szerint névleges és mért értékek) és párhuzamosok száma koncentrációnként;

— a törzsoldat és a vizsgálati oldatok elkészítésének módszere, az esetleg alkalmazott oldó- vagy diszpergálószer;

— hőmérséklet a vizsgálat folyamán;

— fényforrás, irradiancia ($\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$);

— a vizsgálati és a kontrollközeg pH-értéke, valamint a vizsgálati közeg megjelenése a vizsgálat kezdetén és végén;

— oxigénkoncentrációk;

— az analitikai módszer a megfelelő minőség-ellenőrzési adatokkal együtt (validálási vizsgálat, a szórás vagy az analízis konfidenciahatára);

— a mérési változók (pl. hossz, száraz tömeg, nedves tömeg) meghatározásának módszere;

— minden eltérés ettől a vizsgálati módszertől.

Eredmények

— nyers adatok: a növények hajtáshossza és -tömege tálanként és a további mérési változók minden egyes vizsgálati és kontrolledényben minden adatfelvételkor és analízis alkalmával, az 1. táblázatban megadott értékelési ütemterv szerint;

— az egyes mérési változók átlagai és szórásai;

— az egyes koncentrációk növekedési görbéi;

— a megkétszereződési idő/növekedési sebesség a kontrollban a hajtáshossz és a nedves tömeg alapján, ideértve a variációs koefficienst a nedves tömeg hozama tekintetében;

— hatásváltozók számított értéke minden kezelt replikátumra, továbbá az átlag és a variációs koefficiens a párhuzamosok tekintetében;

— a koncentráció–hatás összefüggés grafikus formában;

— a toxikus végpontok becslései a hatásváltozók tekintetében, pl. EC_{50}, és a kapcsolódó konfidencia-intervallumok. ha kiszámították, az LOEC, illetve az NOEC értéke, továbbá a számításukhoz alkalmazott statisztikai módszer;

— ANOVA alkalmazása esetén a kimutatható hatás mértéke (például a legkisebb szignifikáns különbség);

— a kezelt csoportban észlelt esetleges növekedésserkentés;

▼M7

— fitotoxicitásra utaló esetleges látható jelek, valamint a vizsgálati oldatokkal kapcsolatos észrevételek;

— az eredmények szöveges elemzése, beleértve az e vizsgálati módszertől való eltérések vizsgálat kimenetelére gyakorolt hatását.

SZAKIRODALOM

(1) *E melléklet C.26. fejezete*: Lemna sp. növekedésgátlási próba

(2) E melléklet C.3. fejezete: Növekedésgátlási próba, édesvízi alga és cianobaktérium.

(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) E melléklet C.50. fejezete: *Myriophyllum spicatummal* végzett üledékmentes toxicitási vizsgálat.

(8) E melléklet C.28. fejezete: Vegyi anyaggal kiegészített vízzel végzett üledék–víz rendszerű toxicitási vizsgálat árvaszúnyoglárvákkal.

(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**

1. függelék

A SMART- ÉS A BARKO-FÉLE KÖZEG ÖSSZETÉTELE

Összetevő	A reagens vízhez adott mennyisége (*) (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 (egyensúlyban a levegővel)	7,9

(*) ásványmentesített (azaz desztillált vagy ioncserélt) víz

▼M7

2. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Élőanyag-tömeg: a populációban lévő élő anyag nedves és/vagy száraz tömege. Ebben a vizsgálatban az élőanyag-tömeg a fő hajtás, az összes oldalág és az összes gyökér összege.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

Klorózis: a vizsgálati szervezet, különösen az örvök színének zöldről sárgásra történő változása.

ECx: a vizsgálati közegben oldott vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely x % (pl. 50 %) csökkenést okoz a *Myriophyllum spicatum* növekedésében meghatározott expozíciós időszak alatt (kifejezetten ki kell térni rá, ha eltér a teljes vagy szokásos vizsgálati időtartamtól). Ahhoz, hogy egyértelmű legyen, hogy az EC értékét a növekedési sebességből vagy a hozamból nyerték-e, növekedési sebesség esetén „E_rC”-t, hozam esetén „E_yC”-t kell írni, majd ezt követően meg kell adni a mérési változót, például: E_rC (a fő hajtás hossza).

Növekedés: a mérési változóknak, pl. a fő hajtás hosszának, az oldalágak teljes hosszának, a hajtások teljes hosszának, a gyökerek teljes hosszának, a nedves tömegnek, a száraz tömegnek vagy az örvök számának a növekedése a vizsgálati időszakban.

Növekedési sebesség (átlagos fajlagos növekedési sebesség): a mérési változó logaritmikus növekedése az expozíciós idő alatt. *Megjegyzés*: a növekedési sebességgel összefüggő hatásváltozók függetlenek a vizsgálat időtartamától mindaddig, amíg az expozícióval nem érintett kontrollszervezetek növekedési mintázata exponenciális.

Megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC): az a legalacsonyabb vizsgált koncentráció, amely mellett adott expozíciós idő alatt a vegyi anyag statisztikailag szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) csökkenti a növekedésre kifejtett hatást a kontrolltenyészethez képest. Azonban az LOEC-szint feletti valamennyi vizsgálati koncentrációnak olyan ártalmas hatást kell kifejtenie, amely legalább egyenlő az LOEC-szinten megfigyelttel vagy súlyosabb annál. Amennyiben e két feltétel nem teljesíthető, akkor kimerítő magyarázatot kell adni arra, hogy hogyan történt az LOEC (és ennélfogva az NOEC) kiválasztása.

Mérési változók: minden olyan változó, amelyet a vizsgálat végpontjának egy vagy több különböző hatásváltozó segítségével történő kifejezése érdekében mérnek. Ebben a vizsgálati módszerben a mérési változók a fő hajtás hossza, az oldalágak teljes hossza, a hajtások teljes hossza, a gyökerek teljes hossza, a nedves tömeg, a száraz tömeg és az örvök száma.

Monokultúra: egyetlen növényfajból álló tenyészet.

Nekrózis: a vizsgálati szervezet elhalt (például fehér vagy sötétbarna) szövete.

Megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC): az a vizsgálati koncentráció, amely közvetlenül az LOEC alatt helyezkedik el.

Hatásváltozó: a toxikus hatás becslésére használt változó, amely különböző számítási módokkal az élőanyag-tömeg leírására szolgáló bármelyik mért változóból levezethető. Ebben a vizsgálati módszerben hatásváltozó a növekedési sebesség és a hozam, amelyeket a fő hajtás hosszából, a hajtások teljes hosszából, a nedves tömegből, a száraz tömegből vagy az örvök számából, mint mérési változókból származtatnak.

Félstatikus (oldatcserés) vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek során a vizsgálati oldatot bizonyos időközönként lecserélik.

Statikus vizsgálat: olyan vizsgálati módszer, amelynek során a vizsgálati oldatot nem cserélik le.

▼M7

Vizsgálati vegyi anyag: e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

A vizsgálat végpontja: az az általános tényező, amelyre a vizsgálat irányul, és amely a vizsgálati vegyi anyag hatására a kontrolltenyészethez képest megváltozik. Ebben a vizsgálati módszerben a vizsgálat végpontja a növekedésgátlás, amely különböző, egy vagy több mérési változóból származtatott hatásváltozók segítségével fejezhető ki.

Vizsgálati közeg: az a teljes, szintetikus tápoldat, amelyben a vizsgálati növények a vizsgálati vegyi anyag jelenlétében növekednek. A vizsgálati vegyi anyag általában oldott formában van jelen a vizsgálati közegben.

UVCB-k: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakciótermékek vagy biológiai anyagok.

Hozam: az élőanyag-tömeget leíró mérési változó értéke az expozíciós idő végén, mínusz ugyanezen változó értéke az expozíciós idő kezdetén. *Megjegyzés:* ha az expozícióval nem érintett szervezetek növekedési mintázata exponenciális, a hozam alapú hatásváltozók a vizsgálat előrehaladtával csökkennek.

▼M8

C.52. FOGASPONTYON VÉGZETT KIBŐVÍTETT EGYGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS VIZSGÁLAT (MEOGRT)

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 240. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A fogaspontyon végzett kibővített egygenerációs vizsgálat (MEOGRT) egy átfogó, halak több generációjának kezelésén alapuló vizsgálati módszert ír le, amelynek során adatokat gyűjtenek vegyi anyagok, köztük az endokrin rendszert feltételezhetően károsító vegyi anyagok ökológiai veszélyeinek és kockázatainak értékeléséhez. A fogaspontyon végzett kibővített egygenerációs vizsgálatban a halakat a második (F2) generáció kikeléséig (a megtermékenyítés után két hétig) folyamatosan kezelik. Az F2 generáció kikelés utáni fenntartásának hasznosságát további vizsgálatokkal kellene alátámasztani; jelenleg nem áll rendelkezésre elegendő információ olyan körülmények vagy feltételek meghatározásához, amelyek indokolttá tennék az F2 generáció fennmaradásának meghosszabbítását. A vizsgálati módszert azonban új információk és adatok fényében aktualizálhatják. Bizonyos körülmények között például hasznosnak bizonyulhat egy iránymutatás az F2 generáció fenntartásának a szaporodási fázist is magában foglaló meghosszabbításáról (pl. olyan vegyi anyagok esetében, amelyek jelentős mértékű bioakkumulációt idéznek elő, illetve ha más taxonokat érintő transzgenerációs hatás figyelhető meg). Ezzel a vizsgálati módszerrel a vegyi anyagok, köztük az endokrin rendszert potenciálisan zavaró vegyi anyagok halakra gyakorolt potenciális krónikus hatásai értékelhetők. A módszer elsődleges célja a halpopulációnál esetlegesen fellépő releváns hatások (vagyis a túlélésre, a fejlődésre, a növekedésre és a szaporodásra gyakorolt káros hatások) meghatározása, amelyek alapján kiszámítható a megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) vagy a hatásos koncentráció (ECx), ugyanakkor megjegyzendő, hogy az ECx megállapításán alapuló megközelítések ritkán alkalmazhatók az ilyen nagy léptékű vizsgálatokra, ahol a vizsgált koncentrációk számának a kívánt ECx meghatározásához szükséges növelése kivitelezhetetlen lehet, ráadásul a vizsgált állatok nagy száma miatt állatjóléti szempontból jelentős aggályokat vethet fel. Azok a vegyi anyagok, amelyek értékeléséhez nincs szükség több generáció bevonására, illetve amelyek feltételezhetően nem zavarják az endokrin rendszer működését, más vizsgálati módszerekkel esetleg hatékonyabban vizsgálhatók (1). E vizsgálati módszer alkalmazására a japán fogasponty a megfelelő faj, mivel életciklusa rövid és genetikai ivara meghatározható (2), ez utóbbi a vizsgálati módszer egyik alapvető fontosságú eleme. A módszer által leírt egyedi eljárások és megfigyelt végpontok kizárólag a japán fogaspontyra alkalmazhatók. Esetlegesen más kistestű halfajokra (pl. a zabradánióra) is kidolgozhatók hasonló vizsgálati protokollok.

2. Ezzel a vizsgálati módszerrel több biológiai végpont mérhető. A módszer elsősorban a populáció szempontjából releváns paraméterekre – többek között a túlélésre, az általános fejlődésre, a növekedésre és a szaporodásra – gyakorolt esetleges káros hatásokra helyezi a hangsúlyt. Másodsorban, annak érdekében, hogy adatokat szolgáltasson a mechanizmusra vonatkozólag és összekapcsolja más típusú terepvizsgálatok és laboratóriumi vizsgálatok azon eredményeit, amelyek utólagosan bizonyítják egy adott (pl. más tesztekben és vizsgálatokban androgén- vagy ösztrogénhatásúnak bizonyult) vegyi anyag potenciális hormonháztartást zavaró hatását, egyéb hasznos adatokat is biztosít a *vitellogenin* (*vtg)* mRNS (vagy vitellogenin fehérje, VTG) mérése, a fenotípusos másodlagos ivari jellegek (SCC) genetikus ivarhoz kapcsolódásának meghatározása és kórszövettani értékelések révén. Amennyiben azonban egy adott vizsgálati vegyi anyag vagy metabolitjai feltételezhetően nem fejtenek ki hormonháztartást zavaró hatást, szükségtelen lehet e másodlagos végpontok mérése, így megfelelőbbek lehetnek kevésbé erőforrásigényes, kevesebb vizsgált állatot alkalmazó vizsgálatok (1). Az e vizsgálati módszerben használt fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

▼M8

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

3. Miután e meglehetősen összetett vizsgálat validálását korlátozott számú vegyi anyagon és korlátozott számú laboratórium bevonásával végezték el, várható, hogy amikor elegendő számú vizsgálat áll rendelkezésre ezen új vizsgálati terv hatásának megállapítására, a vizsgálati módszert a szerzett tapasztalatok fényében felülvizsgálják, és szükség szerint átdolgozzák. Az adatok az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére vonatkozó fogalmi keretének 5. szintjén alkalmazhatók (3). A vizsgálati módszer első lépéseként szaporodási fázisban lévő felnőtt halakat (az F0 generációt) kezelnek a vizsgálati vegyi anyaggal. A kezelés folytatódik az F1 generáció kifejlődése és szaporodása alatt, egészen az F2 generáció kikeléséig; a vizsgálat ebből kifolyólag lehetővé teszi mind a strukturális, mind az aktivációs endokrin útvonalak értékelését. Az endokrin rendszerrel összefüggő végpontok értelmezhetők bizonyíték súlyán (WoE) alapuló megközelítés keretében.

4. A vizsgálatban megfelelő számú egyedet kell alkalmazni ahhoz, hogy kellő statisztikai erőt képviseljenek a szaporodáshoz kapcsolódó végpontok értékeléséhez (lásd a 3. függeléket), állatjóléti okok miatt ugyanakkor a vizsgált állatok számát a szükséges minimumra kell korlátozni. Tekintettel a vizsgált állatok nagy számára, alaposan mérlegelni kell a vizsgálat szükségességét a már rendelkezésre álló adatok fényében, amelyek a fogaspontyon végzett kibővített egygenerációs vizsgálat számos végpontját illetően tartalmazhatnak releváns információkat. Ezzel kapcsolatban az OECD halakon végzett toxicitásvizsgálatokra vonatkozó keretrendszere nyújthat támpontokat (1).

5. A vizsgálati módszert elsősorban az egyetlen anyag által előidézett hatások azonosítására dolgozták ki. Amennyiben a vizsgálatot keverékeken szükséges alkalmazni, akkor meg kell vizsgálni, hogy az elfogadható eredményeket biztosít-e a szándékolt szabályozási célra.

6. A vizsgálat megkezdése előtt információkat kell szerezni a vizsgálati vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságairól, különösen azért, hogy stabil oldatokat lehessen készíteni a vegyi anyagból. Emellett szükség van egy, a vizsgálati vegyi anyag koncentrációinak ellenőrzésére alkalmas, megfelelő érzékenységű elemzési módszerre.

A VIZSGÁLAT ELVE

7. A vizsgálat első lépéseként tenyészpárokba rendezett, ivarérett (a megtermékenyítéstől számítva legalább 12 hetes) hím és nőstény halakat kezelnek 3 héten keresztül, amelynek során a vizsgálati vegyi anyagot toxikokinetikai tulajdonságainak megfelelően adagolják a szülői generáció (F0) egyedei számára. A negyedik hét első napjához lehető legközelebbi időpontban begyűjtik az ikrákat, amelyekből létrehozzák az F1 generációt. Az F1 generáció felnevelése során (ami összesen 15 hetet vesz igénybe) felmérik a kikelési és a túlélési arányt. Emellett a megtermékenyítés utáni 9–10. héten mintákat vesznek a halaktól a fejlődési végpontok méréséhez, valamint értékelik az ívást a megtermékenyítés utáni 12. héttől a 14. hétig tartó háromhetes időszakon keresztül. Az F2 generáció a szaporodás értékelésének 3. hetét követően indul, nevelésük a kikelés lezárultáig tart.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGI KRITÉRIUMAI

8. A vizsgálat érvényességéhez az alábbi kritériumoknak kell teljesülniük:

— a vizsgálat során az oldott oxigén koncentrációjának mindvégig el kell érnie a levegőtelítettségi érték 60 %-át;

— a vizsgálat teljes időtartama alatt a víz átlaghőmérsékletének 24 és 26 °C között kell lennie. Az egyes akváriumok csak rövid ideig és legfeljebb 2 °C-kal térhetnek el ettől az átlagértéktől;

▼M8

— a kontrollok átlagos fekunditásának az egyes generációk (F0 és F1) tekintetében tenyészpáronként és naponként meg kell haladnia a 20 ikrát. Az értékelési időszak során lerakott ikrák termékenységének meg kell haladnia a 80 %-ot. Ezenfelül az ajánlott 24 kontrollként szolgáló tenyészpárból 16-nak (> 65 %) naponta és tenyészpáronként több mint 20 ikrát kell leraknia;

— a kontrollvizsgálatokban az ikrák kikelési arányának (átlagosan) el kell érnie a 80 %-ot (mind az F1, mind az F2 generációban);

— az F1 kontrollvizsgálatokban az F1 generáció kikeléstől a megtermékenyítés utáni 3. hétig mért túlélési arányának el kell érnie az átlag 80 %-ot, a megtermékenyítés utáni 3. héttől a elpusztításig (vagyis a megtermékenyítés utáni 15. hétig) pedig az átlag 90 %-ot;

— bizonyítékkal kell alátámasztani, hogy a vizsgálati vegyi anyag oldatban lévő koncentrációit az átlagos mért értékek ±20 %-os tartományán belül sikerült tartani.

Bár ez nem érvényességi kritérium, a vízhőmérséklet tekintetében az egy kezeléshez tartozó ismétlések statisztikailag nem különbözhetnek egymástól, csakúgy mint az egy vizsgálaton belüli kezelési csoportok sem különbözhetnek statisztikailag egymástól (a napi hőmérsékletmérések alapján, a rövid idejű ingadozásokat leszámítva).

9. Bár a magasabb koncentrációknak kitett csoportokban csökkenhet a reprodukciós arány, az F0 generáció harmadik legmagasabb koncentrációnak kitett csoportjában és az összes alacsonyabb koncentrációval kezelt csoportjában elegendő szaporulatnak kell lennie ahhoz, hogy megteljenek a keltető inkubátorok. Ezen túlmenően az F1 generáció harmadik legmagasabb koncentrációval és az alacsonyabb koncentrációkkal kezelt csoportjaiban az embriók túlélési arányának lehetővé kell tennie az ivarérés előtti egyedektől vett mintákon végzett végpontértékelést (lásd a 36. és a 38. pontot, valamint a 9. függeléket). Emellett az F1 generáció második legmagasabb koncentrációval kezelt csoportjában a kikelés utáni túlélési aránynak el kell érnie egy minimális szintet (~20 %). Ezek nem kifejezett érvényességi kritériumok, hanem ajánlások, amelyek megbízható NOEC-értékek meghatározását teszik lehetővé.

10. Az érvényességi kritériumoktól való eltérés esetén mérlegelni kell a vizsgálat eredményeinek megbízhatóságára gyakorolt következményeket, az eltéréseket és a mérlegelt következményeket pedig bele kell foglalni a vizsgálati jegyzőkönyvbe.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Berendezés

11. Normál laboratóriumi felszerelés és különösen az alábbiak:

a) oxigéntartalom- és pH-mérők;

b) a víz keménységi fokának és lúgosságának mérésére szolgáló berendezések;

c) a hőmérséklet szabályozására és lehetőleg folyamatos figyelemmel kísérésére is alkalmas készülékek;

d) kémiailag semleges anyagból készült és az ajánlott betelepítési aránynak és állománysűrűségnek megfelelő kapacitású tartályok (lásd a 3. függeléket);

e) megfelelő pontosságú mérleg (azaz ±0,5 mg pontosságú).

▼M8

Víz

12. A vizsgálat céljára bármilyen víz felhasználható, amelyben a vizsgálati fajok kellően hosszú ideig megélnek a vizsgálati körülmények mellett, és növekednek. A víz minőségét a vizsgálat során mindvégig azonos szinten kell tartani. Annak biztosítására, hogy a hígítóvíz ne gyakoroljon nem kívánt hatást a vizsgálat eredményeire (pl. mert komplexet képez a vizsgálati vegyi anyaggal), illetve ne gyakoroljon kedvezőtlen hatásokat a tenyészállomány teljesítményére, időnként mintákat kell venni elemzésre. Nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), főbb anionok és kationok (pl. Ca^{2+}, mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), növényvédő szerek, összes szerves szén és szuszpendált szilárd anyag mérését el kell végezni, például félévente, amennyiben a hígítóvíz ismerten viszonylag állandó minőségű. Az elfogadható minőségű hígítóvíz néhány kémiai tulajdonságának felsorolása a 2. függelékben található. A víz pH-értékének a 6,5–8,5 tartományon belül kell lennie, azonban egy adott vizsgálat során a pH-érték csak ± 0,5 egységgel térhet el a kiindulási értéktől.

Expozíciós rendszer

13. Az expozíciós rendszer kialakítása és az alkalmazott eszközök nem kerültek meghatározásra. A vizsgálati rendszer felépítéséhez üveg, rozsdamentes acél és kémiailag semleges anyagok használhatók, amelyek nem szennyeződtek be korábbi vizsgálatok során. Ebben a vizsgálatban megfelelő expozíciós rendszer lehet a folyamatos vízcserét biztosító átfolyásos rendszer (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Vizsgálati oldatok

14. A vizsgálati vegyi anyag törzsoldatát megfelelő szivattyúval adagolják az expozíciós rendszerbe. Az expozíciót megelőzően a törzsoldat áramlási sebességét a vizsgálati oldatok analitikus módszerrel való megerősítésével összhangban kalibrálják, az áramlási mennyiséget pedig a vizsgálat során rendszeresen ellenőrzik. A vizsgálati oldatot minden kamrában megfelelő módon, a vizsgálati vegyi anyag stabilitásától és a vízminőségtől függően megújítják (pl. legalább napi 5 térfogatcsere és legfeljebb napi 16 térfogatcsere vagy legfeljebb 20 ml/perc áramlás).

15. A kiválasztott koncentrációjú vizsgálati oldatok a törzsoldat hígításával készíthetők el. A törzsoldatot lehetőleg a vizsgálati vegyi anyagnak a hígítóvízbe mechanikai eszközök (pl. keverő és/vagy ultrahang) segítségével történő bekeverésével vagy hozzákeverésével kell elkészíteni. Telítési oszlopok/rendszerek vagy passzív adagolási módszerek (14) is alkalmazhatók a megfelelő koncentrációjú törzsoldat elkészítéséhez. Minden erőfeszítést meg kell tenni az oldószerek vagy hordozók elkerülése érdekében, mivel: (1) bizonyos oldószerek maguk is toxicitást és/vagy nem kívánatos vagy nem várt válaszokat idézhetnek elő, (2) a vegyi anyagoknak a vízoldhatóságuk határán túli vizsgálata (ami gyakran előfordul oldószerek használata esetén) a hatásos koncentráció pontatlan meghatározását eredményezheti, (3) hosszabb távú vizsgálatok során az oldószerek használata jelentős mértékű „biofilmképződést” eredményezhet, ami mikrobiális tevékenységgel jár együtt, amely befolyásolhatja a környezeti feltételeket és a vizsgált koncentrációk fenntartásának képességét, valamint (4) olyan dokumentált adatok hiányában, amelyek igazolják, hogy az oldószer nem befolyásolja a vizsgálat kimenetelét, oldószer használata esetén oldószeres kontrollként szolgáló kezelést kell végezni, aminek állatjóléti következményei vannak, mivel a vizsgálat lefolytatása további állatok bevonását igényli. A nehezen vizsgálható vegyi anyagoknál legvégső esetben lehet oldószert alkalmazni, és a legjobb módszer meghatározása érdekében tanulmányozni kell „A nehezen vizsgálható anyagok és keverékek vízi toxikológiai vizsgálata” című 23. OECD-iránymutatást (15). A megfelelő oldószert a vizsgálati vegyi anyag kémiai tulajdonságai és az oldószer használatára vonatkozó dokumentált adatok rendelkezésre állása alapján választják ki. Oldószerhordozó használata esetén a nem oldószeres (negatív) kontrollok (csak hígítóvíz) mellett értékelni kell megfelelő oldószeres kontrollokat is. Amennyiben elkerülhetetlen az oldószer használata, és mikrobiális tevékenység (biofilmképződés) figyelhető meg, ajánlatos a vizsgálat során (legalább hetente) feljegyezni/jelentésbe foglalni a tartályonkénti biofilmképződést. Ideális esetben az oldószer

▼M8

koncentrációját
állandó értéken tartják az oldószeres kontroll és a vizsgálati vegyi anyaggal történő minden kezelés során. Amennyiben az oldószer koncentrációját nem tartják állandó értéken, az oldószeres kontrollban a vizsgálati kezelés során alkalmazott legmagasabb oldószer-koncentrációt kell vizsgálni. Oldószerhordozó használata esetén az oldószer legmagasabb koncentrációja nem haladhatja meg a 100 µl/l vagy 100 mg/l értéket (15), és az oldószer koncentrációját a lehető legalacsonyabb szinten (pl. 20 µl/l alatt) javasolt tartani annak érdekében, hogy az oldószer ne gyakoroljon hatást a mért végpontokra (16).

Kísérlethez felhasznált állatok

A halak kiválasztása és tartása

16. A vizsgálatban alkalmazott halfaj rövid életciklusa és genetikai ivarának meghatározhatósága miatt a japán fogasponty (*Oryzias latipes*). Habár más kistestű halfajokra is kidolgozható hasonló vizsgálati protokoll, a vizsgálati módszerben leírt egyedi eljárások és megfigyelt végpontok kizárólag a japán fogaspontyra alkalmazhatók (lásd az 1. pontot). A fogasponty könnyen szaporítható fogságban; tenyésztésére vonatkozóan léteznek közzétett módszerek (17) (18) (19), továbbá rendelkezésre állnak adatok a rövid időn belüli elhullásával, korai életszakaszával és teljes életciklusával kapcsolatban végzett vizsgálatokból (5) (6) (8) (9) (20). A halakat 16 órás világos és 8 órás sötét időszakot tartalmazó megvilágítás mellett tartják. A halakat élő *Artemia* nauplius sórákkal etetik, szükség esetén kereskedelmi forgalomban kapható pelyhesített haleledellel kiegészítve. Rendszeresen ellenőrizni kell, hogy a kereskedelmi forgalomban beszerezhető haleledel nem tartalmaz-e szennyező anyagokat.

17. A megfelelő haltenyésztési gyakorlatok betartása esetén nem szükséges egyedi tenyésztési protokollt alkalmazni. A fogasponty nevelhető például úgy, hogy 2 literes tartályokba tartályonként 240 lárvát helyeznek a megtermékenyítéstől számított 4. hétig, majd 2 literes tartályokban tartályonként 10 halat tenyésztenek a megtermékenyítéstől számított 8. hétig, amikor tenyészpáronként 2 literes tartályba helyezik át őket.

Akklimatizáció és a halak kiválasztása

18. A kísérleti halakat egyetlen laboratóriumi tenyészetből választják ki, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább két hétig a vizsgálat során alkalmazandó vízminőség és megvilágítás mellett akklimatizálják (megjegyzés: az akklimatizációs időszak nem in situ expozíciót előkészítő időszak). Ajánlatos a kísérleti halakat saját tenyészetből beszerezni, mivel a felnőtt halaknál a szállítás stresszhatást vált ki, ami befolyásolhatja az ívás megbízhatóságát. A halakat a tartási időszak és az expozíciós fázis alatt naponta kétszer nauplius sórákkal etetik, szükség esetén kereskedelmi forgalomban kapható pelyhesített haleledellel kiegészítve. A megfelelő szaporulat biztosítása érdekében a vizsgálat megkezdéséhez legalább 42 tenyészpár szükséges (illetve 54 tenyészpár, ha az oldószer használatát alátámasztó dokumentált adatok hiánya miatt oldószeres kontrollt kell végezni). Emellett az F0 generáció minden tenyészpárjánál ellenőrizni kell, hogy XX-XY kromoszómával rendelkeznek-e (ami az egyes ivarok esetében a nemi kromoszómák normál eloszlása), hogy elkerülhető legyen a spontán változás következtében XX kromoszómával rendelkező hímek esetleges belefoglalása a vizsgálatba (lásd a 39. pontot).

▼M8

19. Az akklimatizációs fázis során fel kell jegyezni a haltenyészetben tapasztalt mortalitási arányt, majd egy 48 órás szoktatási időszakot követően az alábbi követelményeket kell alkalmazni:

— amennyiben a vizsgálati rendszerbe történő áthelyezést megelőző hét napban a mortalitás a halpopuláció 10 %-ánál nagyobb: az egész halállományt ki kell cserélni;

— amennyiben a vizsgálati rendszerbe történő áthelyezést megelőző hét napban a mortalitás a halpopuláció 5–10 %-át érinti: a kéthetes akklimatizációs időszakot további hét nappal meg kell hosszabbítani; amennyiben a mortalitási arány a második hétnapos időszakban meghaladja az 5 %-ot, az egész állományt ki kell cserélni;

— amennyiben a vizsgálati rendszerbe történő áthelyezést megelőző hét napban a mortalitás a halpopuláció kevesebb mint 5 %-át érinti: az állomány alkalmazható a vizsgálathoz.

20. A vizsgálatot megelőző kéthetes akklimatizációs időszak és az expozíciós időszak alatt a halak nem kaphatnak betegség elleni kezelést, lehetőség szerint a betegségeket egyáltalán ne kezeljék. Betegség klinikai tüneteket mutató halak nem használhatók a vizsgálatban. A vizsgálatot megelőző tenyésztési időszakban tett megfigyeléseket, valamint a megelőző és terápiás kezeléseket fel kell jegyezni.

21. Az expozíciós fázist ivari kétalakúságot mutató, ivarérett kifejlett állatok laboratóriumi készletéből származó, genetikai ivaruk szerint azonosított, 25 ±2 °C-on tenyésztett halakkal kell megkezdeni. Olyan halakat kell használni, amelyek a kezelést megelőző hét során bizonyították nemzőképességüket (vagyis élő utódokat nemzettek). A vizsgálatban alkalmazott egész halállomány tekintetében a halak vizsgálat elején mért ivaronkénti egyéni testtömegének az azonos ivarú halak testtömege számtani átlagának ± 20 %-os tartományában kell lennie. Az átlagos testtömeg becsült értékének meghatározása érdekében a vizsgálat előtt le kell mérni a halak egy részmintájának tömegét. Olyan halakat kell kiválasztani, amelyek a megtermékenyítéstől számítva legalább 12 hetesek, a nőstények testtömege minimum 300 mg, a hímeké pedig minimum 250 mg.

VIZSGÁLATI TERV

Vizsgálati koncentrációk

22. A vizsgálati vegyi anyagot öt koncentrációban ajánlatos vizsgálni, plusz a kontroll(ok). A vizsgálati koncentrációtartomány meghatározásánál minden információforrást figyelembe kell venni, ideértve a mennyiségi szerkezetaktivitási összefüggéseket (QSAR-okat), az analógokból kereszthivatkozással kapott adatokat, a halakon végzett vizsgálatok, például az akut toxicitási vizsgálatok (e melléklet C.1. fejezete), a halakon végzett rövid távú reprodukciós vizsgálat (e melléklet C.48. fejezete) és más vizsgálati módszerek, pl. e melléklet C.15., C.37., C.41., C.47. vagy C.49. fejezetében szereplő vizsgálatok (21) (22) (23) (24) (25) (26) rendelkezésre álló eredményeit, illetve ha szükséges, egy, lehetőleg reprodukciós fázist is magában foglaló dóziskereső vizsgálat eredményeit. Amennyiben dóziskereső vizsgálatra van szükség, azt a végleges vizsgálat során alkalmazott körülményekhez hasonló feltételek (vízminőség, vizsgálati rendszer, állatok betelepítése) mellett lehet elvégezni. Amennyiben oldószer használata szükséges, és nem állnak rendelkezésre dokumentált adatok, a dóziskereső vizsgálat használható az oldószer megfelelőségének megállapítására. A legmagasabb vizsgált koncentráció nem haladhatja meg a 10 mg/l vagy 1/10 koncentrációjú 96h-LC50 vízoldhatóságát (27). A legalacsonyabb koncentrációnak 10-szer–100-szor alacsonyabbnak kell lennie a legmagasabb koncentrációnál. Öt vizsgálati koncentráció alkalmazása nem csupán a dózis-válasz összefüggés mérését teszi lehetővé, hanem a megfigyelhető hatást okozó legalacso-

▼M8

nyabb
koncentráció (LOEC) és a megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) meghatározását is, amelyek bizonyos szabályozói programokban vagy jogrendszerben szükségesek a kockázatértékeléshez. Általában a vizsgálati vegyi anyag nominális koncentrációi közötti osztásköz az egymás melletti kezelési szintek tekintetében legfeljebb 3,2.

Vizsgálati csoportok és kontrollok ismétlései

23. Vizsgálati koncentrációnként a vizsgálati kamrákból legalább hat ismétlést kell készíteni (lásd a 7. függeléket). A reprodukciós fázis során (az F0 generáció kivételével) az ismétlések számát meg kell duplázni a fekunditás méréséhez, ebben a fázisban minden ismétlés csak egyetlen tenyészpárt tartalmaz (lásd a 42. pontot).

24. A vizsgálati koncentrációk mellett hígítóvizes kontrollt és ha szükséges, oldószeres kontrollt is kell futtatni. A megfelelő statisztikai erő biztosítása érdekében a kontrollvizsgálatokban a kamrákat dupla mennyiségű ismétlésben kell vizsgálni (vagyis a kontrollokhoz legalább tizenkét ismétlést kell alkalmazni). A reprodukciós fázis során a kontrollokban alkalmazott ismétlések számát meg kell kétszerezni (vagyis legalább 24 ismétlést kell alkalmazni, és mindegyik ismétlés csak egy tenyészpárt tartalmaz). A reprodukciós fázist követően a kontrollként szolgáló ismétlések legfeljebb 20 embriót (halat) tartalmazhatnak.

ELJÁRÁS

A vizsgálat elindítása

25. A vizsgálat F0 generációjának elindításához használt, szaporodásbiológiailag aktív felnőtt halak kiválasztása két követelmény alapján történik: életkor (jellemzően a megtermékenyítéstől számítva legalább 12, legfeljebb 16 hetes egyedek) és a testtömeg (nőstényeknél minimum 300 mg, hímeknél minimum 250 mg).

26. A fenti követelményeknek megfelelő nőstény-hím párokat páronként áthelyezik egy-egy tartályba, vagyis a vizsgálat kezdetén a tartályokból tizenkét ismétlést készítenek a kontrollokhoz és hat ismétlést a vegyi anyaggal való kezelésekhez. A tartályokat véletlenszerűen kezelési (pl. T1–T5 és kontroll) és ismétlési (pl. A–L kontroll és A–F kezelési) csoportba sorolják, majd kialakítják az expozíciós rendszert, az egyes tartályokban biztosítva a megfelelő anyag áramlását.

Az expozíció körülményei

27. A vizsgálati paraméterek és körülmények teljes összefoglalása a 3. függelékben található. A vizsgálati paraméterek és körülmények megvalósítása esetén a kontrollként szolgáló halak végpontértékei hasonlóak a 4. függelékben feltüntetett értékekhez.

28. A vizsgálat során minden kezelt és kontrollcsoport legalább egy kísérleti edényében mérni kell az oldott oxigén koncentrációját, a pH-értéket és a hőmérsékletet. A hőmérséklet kivételével ezeket a méréseket a teljes expozíciós időszak során legalább heti egy alkalommal el kell végezni. Az átlagos vízhőmérsékletnek az egész vizsgálat során 24 és 26 °C között kell lennie. Az expozíciós időszak alatt mindvégig naponta mérni kell a hőmérsékletet. A víz pH-értékének a 6,5–8,5 tartományon belül kell lennie, azonban egy adott vizsgálat során a pH-érték csak ± 0,5 egységgel térhet el a kiindulási értéktől. Az egy kezeléshez tartozó ismétlések statisztikailag nem különbözhetnek egymástól, csakúgy mint az egy vizsgálaton belüli kezelési csoportok sem különbözhetnek statisztikailag egymástól (a napi hőmérsékletmérések alapján, a rövid idejű ingadozásokat leszámítva).

▼M8

Az expozíció időtartama

29. A vizsgálatban az F0 generáció szaporodóképes halait három héten át kezelik. A 4. héten, körülbelül a 24. vizsgálati napon létrehozzák az F1 generációt, az F0 generáció tenyészpárjait pedig kíméletesen leölik, az egyedek testtömegét és hosszát feljegyzik (lásd a 34. pontot). Ezt követően az F1 generációt további 14 hétig (összesen 15 hétig) kezelik, majd az F2 generációt kezelik a kikelésig tartó két héten keresztül. A vizsgálat teljes időtartama alapvetően 19 hét (vagyis az F2 generáció kikeléséig tart). A vizsgálat ütemezését a 2. táblázat, további részletes magyarázatát pedig a 9. függelék tartalmazza.

Etetési rend

30. A halak *ad libitum* etethetők *Artemia* sórákkal (24 órás naupliusszal), szükség esetén kereskedelmi forgalomban kapható pelyhesített haleledellel kiegészítve. A kereskedelmi forgalomban beszerezhető pelyhesített haleledelben rendszeresen vizsgálni kell a szennyező anyagok – szerves klórt tartalmazó növényvédő szerek, policiklikus aromás szénhidrogének (PAH) és poliklórozott bifenilek (PCB-k) – jelenlétét. Kerülni kell az olyan táplálékokat, amelyek nagy arányban tartalmaznak a vizsgálatban kapott választ esetlegesen befolyásoló, endokrin rendszerre ható anyagokat (pl. fitoösztrogéneket). Az el nem fogyasztott táplálékot és az ürüléket szükség szerint el kell távolítani a kísérleti edényekből, pl. a tartályok alját szifonnal megtisztítva. A tartályok oldalát és alját hetente egy vagy két alkalommal szintén meg kell tisztítani (pl. spatulával le kell kaparni). Az etetési ütemtervre vonatkozó példa az 5. függelékben található. A haleledel mennyisége az egyes tartályokban tartott halak számán alapul. Ezért a halták mennyiségét a tartályban bekövetkezett elhalálozásokkal párhuzamosan csökkenteni kell.

Analitikai meghatározások és mérések

31. Az expozíciós időszak megkezdése előtt gondoskodni kell a vegyi anyagot adagoló rendszer megfelelő működéséről. Az összes szükséges analitikai módszernek megalapozottnak kell lennie, ideértve a vegyi anyag tesztrendszerben való stabilitásával kapcsolatos ismereteket. A vizsgálat során a vizsgálati vegyi anyag koncentrációit megfelelő időközönként – lehetőleg legalább hetente egyszer – meghatározzák az egyes kezelési csoportok egyik ismétlésében, az adott kezelési csoporton belül forgórendszerben minden héten másik ismétlést vizsgálva.

32. A vizsgálat során a hígítóvíz és a törzsoldat áramlási sebességét időszakosan (legalább hetente három alkalommal) ellenőrizni kell. Az eredményeket célszerű a ténylegesen mért koncentrációértékekre alapozni. Amennyiben azonban az oldatban lévő vizsgálati vegyi anyag koncentrációját sikerült a vizsgálat során mindvégig a mért átlagértékek ±20 %-os tartományán belül tartani, akkor az eredményeket a névleges vagy a mért értékekre is lehet alapozni. A halakban jelentős mennyiségben felhalmozódó vegyi anyagok esetében a vizsgálati koncentrációk a halak növekedésével párhuzamosan csökkenthetők. Ilyenkor érdemes a kísérleti oldat megújítási arányát minden kamrában úgy meghatározni, hogy a vizsgálati koncentrációk a lehető legállandóbbak legyenek.

Megfigyelések és mért végpontok

33. A mért végpontok közé tartozik a fekunditás, a termékenység, a kikelés, a növekedés és a túlélés, ezek alapján értékelik az esetleges populációszintű hatásokat. Naponta meg kell figyelni a halak viselkedését is, és a szokatlan viselkedési formákat fel kell jegyezni. Más mechanisztikus végpontok közé tartozik a máj *vtg* mRNS vagy VTG fehérje szintjének mérése immunvizsgálattal (28), az ivari fenotípusos markerek, például a hímekre jellemző farok alatti úszó papilláris nyúlványai, az ivarmirigy szerinti nem szövettani értékelése, valamint a vese, a máj és az ivarmirigy kórszövettani értékelése (lásd az 1. táblázatban felsorolt végpontokat). Ezeket a konkrét végpontokat az egyedek genetikai ivara szerint értékelik, amelyet a fogasponty hímivart meghatározó *dmy* génjének jelenléte vagy hiánya alapján állapítanak meg (lásd a 41. pontot). Ezeken túlmenően értékelik az ívásig eltelt

▼M8

időt is. Emellett az egyszerű fenotípusos ivararány meghatározható a farok alatti úszó papilláris nyúlványainak megszámlálása révén, amelynek alapján az egyes fogaspontyok fenotípusos hímként vagy nőstényként azonosíthatók. Ez a vizsgálati módszer várhatóan nem észleli a várt ivararánytól való kis mértékű eltéréseket, mivel az egyes ismétlésekben vizsgált halak viszonylag csekély száma nem biztosít kellő statisztikai erőt. A kórszövettani vizsgálat során az ivarmirigyet értékelik és sokkal hatékonyabb elemzéseket végeznek az ivari fenotípus genetikus ivar tükrében való meghatározásához.

34. E vizsgálati módszer elsődleges célja egy adott vizsgálati vegyi anyag esetleges populációszintű hatásainak felmérése. A mechanisztikus végpontok (a VTG, a másodlagos ivari jellegek (SCC) és az ivarmirigyek kórszövettani elemzésével feltárható bizonyos hatások) szintén hozzájárulhatnak annak megállapításához, hogy valamely hatás visszavezethető-e endokrin aktivitásra. Ezeket a mechanisztikus végpontokat azonban befolyásolhatja szisztémás és egyéb jellegű toxicitás is. Következésképpen a máj és a vese részletes kórszövettani értékelésével elősegíthető a mechanisztikus végpontoknál jelentkező válaszok jobb megértése. Ha ilyen részletes értékelésekre nem kerül sor, a kórszövettani vizsgálat során tapasztalt súlyos rendellenességeket akkor is fel kell jegyezni és fel kell tüntetni a jegyzőkönyvben.

A halak humánus elpusztítása

35. Az F0 és F1 generáció kezelésének végeztével, valamint amikor részmintát veszek az ivarérés előtt álló halakból, a halakon a nyálkahártya-irritáció csökkentése érdekében 300 mg/l $NaHCO_3$ (nátrium-hidrogénkarbonát, CAS-száma: 144-55-8) oldattal pufferolt megfelelő mennyiségű érzéstelenítő oldattal (pl. trikain-metán-szulfonát, MS-222 (CAS-száma: 886-86-2), 100–500 mg/l) eutanáziát kell végrehajtani. Ha a halakon jelentős mértékű szenvedésre utaló jelek figyelhetők meg és elhullásközeli állapotban vannak (súlyosan szenvednek és elhullásukat megbízhatóan előre lehet jelezni), az állatokat érzésteleníteni kell és el kell altatni, és adatelemzés szempontjából mortalitásként kell kezelni. A betegség miatt elaltatott halakról feljegyzést kell készíteni, amit fel kell tüntetni a jegyzőkönyvben. Attól függően, hogy a halakat a vizsgálat mely szakaszában altatják el, a halakon kórszövettani elemzést végezhetnek (a halat fixálhatják az esetleges kórszövettani elemzéshez).

Az ikrák és a lárvák kezelése

A tenyészpárok ikráinak begyűjtése a következő generáció szaporításához

36. Az ikrákat az F0-ból az F1 generáció létrehozásához a vizsgálat 4. hetének, az F1-ből az F2 generáció létrehozásához pedig a vizsgálat 18. hetének első napján (vagy szükség esetén első két napján) gyűjtik be. A 18. héten az F1 generáció felnőtt halai a megtermékenyítéstől számítva 15 hetesek. Az ikrák begyűjtésének kezdete előtti napon minden tartályból el kell távolítani az összes ikrát, ezáltal biztosítva, hogy a tenyészpártól begyűjtött valamennyi ikra egyetlen ívásból származzon. Az ívást követően a nőstény fogasponty néha a végbélnyílása közelében hordozza az ikrákat, amíg le nem rakja őket szubsztrátumba. Ha nincs szubsztrátum a tartályban, az ikrák vagy a nőstényen, vagy a tartály alján helyezkednek el. Elhelyezkedésüktől függően az ikrákat a nőstényről vagy a tartály aljáról kell szifonnal eltávolítani, az F0 generációnál a vizsgálat 4. hetében, az F1 generációnál pedig a vizsgálat 18. hetében. Az egy kezelésen belül begyűjtött ikrákat egybegyűjtik, majd szétosztják az inkubációs kamrák között.

▼M8

37. A lerakott ikrákat együtt tartó ikrafonalakat el kell távolítani. Minden tenyészpártól (ismétlésenként 1 pártól) begyűjtik a megtermékenyített ikrákat (legfeljebb 20-at), kezelésenként egybegyűjtik őket, majd szisztematikusan szétosztják a megfelelő inkubációs kamrák között (6. és 7. függelék). Jó minőségű preparálómikroszkóppal láthatók a megtermékenyítés/fejlődés korai jelei, úgy mint a külső magzatburok (chorion), a folyamatban lévő sejtosztódás vagy a hólyagcsíra kialakulása. Az inkubátor kamrák elhelyezhetők az egyes kezelésekhez felállított külön inkubátor akváriumokban (amely esetben a vízminőség paramétereit és a vizsgálati vegyi anyag koncentrációit ezekben kell mérni), illetőleg azokban az akváriumokban, amelyek majd otthont adnak a kikelt lárváknak (pl. a szabad embrióknak). Amennyiben a begyűjtés igénybe vesz egy második napot is (a vizsgálat 23. napját), a két nap alatt begyűjtött valamennyi ikrát egybegyűjtik, majd szisztematikusan szétosztják az egyes kezelt ismétlések között.

Ikrák nevelése a kikelésig

38. A megtermékenyített ikrákat folyamatosan mozgatják, például az ikrakeltető inkubátoron belül előállított légbuborékokkal, vagy az inkubátor függőleges irányú mozgatásával. A megtermékenyített ikrák (embriók) mortalitását naponta ellenőrizni és rögzíteni kell. Az elpusztult ikrákat eltávolítják az inkubátorokból (9. függelék). A megtermékenyítés utáni 7. napon leállítják az ikrák mozgatását vagy csökkentik annak intenzitását, hogy a megtermékenyített ikrák le tudjanak ülepedni az inkubátor aljára. Ez ugyanis elősegíti a többnyire a következő egy vagy két napban bekövetkező kikelésüket. Az egyes ismétlésekben kikelt ivadékokat (fiatal lárvákat; szabad embriókat) kezelésenként és kontrollonként egybegyűjtik és megszámlálják. Azokat a megtermékenyített ikrákat, amelyek nem keltek ki a kontroll átlagos kikelési napjának kétszereséig (ami általában a megtermékenyítés utáni 16. vagy 18. nap), életképtelennek tekintik és eltávolítják.

39. Minden tartályba tizenkét ivadékot helyeznek át. A inkubátor kamrákból egybegyűjtik az ivadékokat, és szisztematikusan szétosztják a tartályok között (7. függelék). Ez történhet úgy, hogy véletlenszerűen kiválasztanak egy ivadékot az egybegyűjtött kezelt állományból, majd egymás után hozzátesznek egy-egy válogatás nélkül kiválasztott ivadékot az egyik akváriumba. Mindegyik tartálynak azonos számú (n=12) kikelt lárvát kell tartalmaznia (tartályonként legfeljebb 20-at). Amennyiben nincs elég ivadék az összes kezelni szándékozott ismétlés feltöltéséhez, akkor arra kell törekedni, hogy a lehető legtöbb ismétlés tartalmazzon 12 ivadékot. Az ivadékok biztonságos kezelését vastag üveg pipettával lehet biztosítani. A létszám feletti ivadékokat érzéstelenítővel humánus módon elaltatják. A tenyészpárok kialakítását megelőző néhány hétben fel kell jegyezni az egyes ismétléseknél megfigyelt első ívási esemény napját.

Tenyészpárok kialakítása

Úszók bevágása és a genotípusos ivar megállapítása

40. Az úszók genotípusos ivar meghatározására szolgáló bevágására a megtermékenyítés utáni 9–10. héten (pl. az F1 generáció esetében a vizsgálat 12–13. hetében) kerül sor. A tartályban lévő valamennyi halat – jóváhagyott módszerek, pl. IACUC használatával – elaltatják, majd az egyedek genotípusos ivarának meghatározásához kis méretű szövetmintát vesznek minden hal farokúszójának háti vagy hasi csúcsából (29). Az egy ismétlésből származó halak tárolhatók a tartályban elhelyezett kis ketrecekben, lehetőleg egyenként. Egy ketrecben tárolható két hal is, amennyiben megkülönböztethetők egymástól. Megkülönböztethetőségük biztosítható például úgy, hogy a szövetmintavétel során más-más részét vágják le a farokúszónak (pl. az egyiknél a háti csúcsát, a másiknál a hasi csúcsát).

▼M8

41. A fogasponty genotípusos ivarát az Y-kromoszómán található azonosított gén (*dmy*) alapján határozzák meg. A *dmy* jelenléte a fenotípustól függetlenül XY egyedet jelez, míg a *dmy* hiánya a fenotípustól függetlenül XX egyedet jelez (30); (31). Minden levágott úszóból kivonják a dezoxiribonukleinsavat (DNS-t), majd polimeráz láncreakciót (PCR) alkalmazó módszerekkel megállapítják a *dmy* jelenlétét vagy hiányát (lásd e melléklet C.41. fejezetének 9. függelékét, vagy a (29) 3. és a 4. függelékét).

Tenyészpárok létrehozása

42. A genotípusos ivarról kapott információk alapján kialakítják az XX-XY tenyészpárokat, a fenotípus külső jeleitől függetlenül, amelyeket módosíthatott a vizsgálati vegyi anyaggal való kezelés. Az egyedek genotípusos ivarának megállapítását követő napon minden replikátumtartályból véletlenszerűen kiválasztanak két XX és két XY halat, és létrehoznak két XX-XY tenyészpárt. Amennyiben valamely ismétlés nem tartalmaz két XX vagy két XY halat, a kezeléshez tartozó többi ismétlésből kell kiválasztani a megfelelő ivarú halakat. Arra kell törekedni, hogy a tenyészpárok ajánlott száma (12) minden kezelt és kontrollként szolgáló tartályban biztosítva legyen (24). A nyilvánvaló rendellenességeket (pl. úszóhólyag problémákat, gerinc deformitást, szélsőséges méretbeli eltérést stb.) mutató halakból nem alakítanak ki tenyészpárokat. Az F1 generáció reprodukciós fázisában minden tartályban csak egyetlen tenyészpárt szabad elhelyezni.

Mintavétel ivarérés előtt álló halakból és a végpontok értékelése

Mintavétel nem tenyészpár halakból

43. A tenyészpárok kialakítását követően a további tenyésztés célja ki nem választott halakat a vizsgálat 12–13. hetében (F1) kíméletesen leölik, hogy megmérik az ivarérés előtt álló halak végpontjait. Rendkívül fontos, hogy a halakat olyan módon kezeljék, hogy a tenyészpárok kiválasztásához meghatározott genotípusos ivart vissza lehessen vezetni az egyedekre. Az összegyűjtött adatokat ugyanis az adott egyed genotípusos ivarának fényében elemzik. Az egyes halakon számos végpont mérését végzik el, azon belül: meghatározzák a növendék/ivarérés előtt álló halak túlélési arányát (a vizsgálat 7–12./13. hetében, F1), a hossznövekedést (standard hossz mérhető, ha a genetikai ivar elemzéséhez történő mintavétel során lerövidítették a farokúszót. Teljes hossz mérhető, ha a *dmy* meghatározásához a farokúszónak csak a háti vagy hasi részéből vettek mintát), a testtömeget (nedves tömeg, szárazra itatva), a máj *vtg* mRNS (vagy VTG) szintjét és a farok alatti úszó papilláris nyúlványainak számát (lásd az 1. és a 2. táblázatot). A kezelt csoportok átlagos növekedésének kiszámításához szükség van a tenyészpárok testtömegére és testhosszára is.

Szövetmintavétel és a vitellogenin mérése

44. A májat preparálják, majd a *vtg* mRNS (vagy VTG) méréséig –70 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tárolják. A halak farkát a farok alatti úszóval együtt megfelelő (például Davidson-féle) fixálószerben tartósítják, illetve lefényképezik, hogy később megszámlálhatók legyenek a farok alatti úszó papilláris nyúlványai. Ekkor szükség szerint más szövetmintákat is levehetnek és tartósíthatnak (pl. az ivarmirigyből). A máj VTG-koncentrációját homológ ELISA eljárással kell mérni (a fogasponty esetében ajánlott eljárásokat lásd a jelen melléklet C.48. fejezetének 6. függelékében). A vtg mRNS szintjének mérésére szolgáló módszereket – amelyek során a *vtg I* gén mRNS-ét kivonják a májmintából és kvantitatív polimeráz

▼M8

láncreakcióval meghatározzák a (teljes mRNS 1 ng-jában lévő) *vtg I* génkópiák számát – az U.S. EPA dolgozta ki (29). A kezelt és a kontrollcsoportok *vtg* génkópiáinak számszerű meghatározása helyett egy kevesebb erőforrást igénylő és technikailag egyszerűbben kivitelezhető módszer a kezelt és kontrollcsoportokban létrejövő *vtg I* expresszió relatív (valahányszoros) változásának meghatározása.

Másodlagos ivari jellegek

45. Rendes körülmények között csak ivarérett felnőtt hím fogaspontyok rendelkeznek papilláris nyúlványokkal, amelyek bizonyos farok alatti úszósugarak összekapcsolódott lemezein fejlődnek ki másodlagos ivari jellegként, potenciális biomarkert szolgáltatva az endokrin rendszert zavaró hatások felméréséhez. A farok alatti úszó papilláris nyúlványainak (papilláris nyúlványokkal rendelkező összekapcsolódott lemezek számának) meghatározási módszerét a 8. függelék tartalmazza. Emellett a farok alatti úszó papilláris nyúlványainak számát használják fel az adott egyed külsőleg fenotípusos hímként vagy nőstényként való besorolására, amelynek alapján meghatározzák az egyes ismétlések egyszerű ivararányát. A nullánál több papilláris nyúlvánnyal rendelkező fogaspontyok hímnek minősülnek; a papilláris nyúlvány nélküli fogaspontyok nősténynek minősülnek.

A fekunditás és a termékenység értékelése

46. A fekunditást és a termékenységet az F0 generáció tekintetében a vizsgálat 1–3. hetében, az F1 generáció tekintetében pedig a vizsgálat 15–17. hetében értékelik. Minden tenyészpár ikráit 21 egymást követő napon keresztül naponta begyűjtik. Az ikrákat reggelente óvatosan eltávolítják a hálóba fogott nőstényekről és/vagy szifonnal az akvárium aljáról. Az egyes ismétlésekben vizsgált tenyészpárokat illetően naponta feljegyzik a fekunditást és a termékenységet. A fekunditást a lerakott ikrák száma alapján, a termékenységet pedig a számlálás idején megtermékenyítettnek és életképesnek minősített ikrák száma alapján határozzák meg. A számlálást az ikrák begyűjtése után a lehető leghamarabb el kell végezni.

47. Az ismétléseknél mért fekunditást, vagyis a tenyészpáronkénti ikrák számát naponta feljegyzik, és az ismétlések átlaga alapján az ajánlott statisztikai eljárások szerint elemzik. Egy adott ismétlés termékenységét úgy határozzák meg, hogy a tenyészpár által termelt megtermékenyített ikrák összesített számát elosztják a tenyészpár által termelt ikrák összesített számával. Statisztikailag a termékenységet ismétlésenkénti arányszámként elemzik. Egy adott ismétlés kikelési arányának meghatározásához elosztják az ivadékok számát a betelepített embriók számával (ami általában 20). Statisztikailag a kikelési arányt ismétlésenkénti arányszámként elemzik.

Mintavétel felnőtt halakból és a végpontok értékelése

Mintavétel tenyészpár halakból

48. A vizsgálat 17. hetét követően (vagyis miután az F2 generációt sikerrel elindították), az F1 generáció felnőtt halait kíméletesen leölik, és értékelik a különböző végpontokat (lásd az 1. és a 2. táblázatot). A farok alatti úszóról felvételt készítenek a farok alatti úszó papilláris nyúlványainak értékeléséhez (lásd a 8. függeléket) és/vagy a farkat a végbélnyílás poszterior végétől eltávolítják és fixálják a papilláris nyúlványok későbbi megszámlálásához. Ekkor igény szerint a farokúszó egy részéből mintát vehetnek és eltárolhatják a genetikai ivar (*dmy)* ellenőrzéséhez. Szükség szerint szövetmintát lehet venni a *dmy* elemzésnek megismétléséhez, amelynek révén ellenőrizhető egy adott hal genetikus ivara. A testüreget felnyitják, hogy lehetővé tegyék a megfelelő (pl. Davidson-féle) fixálószer átáramlását, mielőtt az egész testet belemerítenék a fixálószerbe. Ha azonban a fixálás előtt gondoskodnak a megfelelő permeabilitásról, a testüreget nem szükséges felnyitni.

▼M8

Kórszövettan

49. Minden halon szövettani vizsgálatot végeznek az ivarmirigyszövet kóros elváltozásainak megállapításához (30); (29). A 33. pontban említettek szerint a vizsgálat során értékelt más mechanisztikai végpontokat (pl. a VTG, a másodlagos ivari jellegek (SCC) és az ivarmirigyek kórszövettani elemzésével feltárható bizonyos hatások) befolyásolhatja szisztémás vagy más jellegű toxicitás. Következésképpen a máj és a vese részletes kórszövettani értékelésével elősegíthető a mechanisztikus végpontoknál jelentkező válaszok jobb megértése. Ha ilyen részletes értékelésekre nem kerül sor, a kórszövettani vizsgálat során tapasztalt súlyos rendellenességeket akkor is fel kell jegyezni és fel kell tüntetni a jegyzőkönyvben. Fontolóra vehető a (kontrollhoz képest) legmagasabb koncentrációval kezelt csoporttól a hatás nélküli koncentrációval kezelt csoportig lefelé lépegető vizsgálat, bár ajánlatos tanulmányozni a kórszövettani iránymutatást (29). Általában feldolgoznak minden mintát, illetve metszetet készítenek belőlük, amelyeket a kórboncnok elemez. Megjegyzendő, hogy lefelé haladó megközelítés alkalmazásánál a Rao–Scott Cochrane–Armitage by Slices (RSCABS) eljárás azon a feltevésen alapul, hogy a dózisszintek növelésével párhuzamosan növekszik a biológiai (patológiai) hatás. Ezért a statisztikai erő csökkenésével kell számolni, ha egyetlen magas dózist vizsgálnak közbeeső dózisok nélkül. Amennyiben nincs szükség statisztikai elemzéshez annak megállapítására, hogy a magas dózis nem fejt ki hatást, akkor ez a megközelítés elfogadható lehet. Az értékelés során megállapítják az ivari fenotípust.

Egyéb észrevételek

50. A fogaspontyon végzett kibővített egygenerációs vizsgálatból származó adatok felhasználhatók (pl. bizonyíték súlyán alapuló megközelítés keretében) arra, hogy egyidejűleg értékeljenek legalább két, reprodukciós károsodást okozó általános káros kimeneti út típust: a) a hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) endokrin tengely károsodását előidéző, endokrin rendszer által közvetített utakat; és b) nem az endokrin rendszer által közvetített toxicitás révén a túlélés, a növekedés (testhossz és testtömeg), valamint a szaporodás visszaesését okozó utakat. Ez a vizsgálat magában foglalja a jellemzően a krónikus toxicitási vizsgálatokban, például a teljes életciklussal és a korai életszakasszal kapcsolatos vizsgálatokban mért végpontokat, amelyek felhasználhatók mind a nem endokrin rendszer által közvetített toxikus hatásmechanizmusok, mind az endokrin rendszer által közvetített toxicitási utak jelentette veszélyek értékelésére. A vizsgálat során naponta meg kell figyelni a halak viselkedését, és a szokatlan viselkedési formákat fel kell jegyezni. Emellett fel kell jegyezni az elhalálozásokat, valamint ki kell számolni a halaknak a vizsgálat 6./7. hetében bekövetkező selejtezéséig megfigyelt túlélési arányát, a selejtezéstől az ivarérés előtt álló halakból történő mintavételig (a megtermékenyítés utáni 9–10. hét) megfigyelt túlélési arányát és a párok kialakításától a felnőtt halakból történő mintavételig megfigyelt túlélési arányát.

1. táblázat

A MEOGRT végpontjainak áttekintése (*)

Életszakasz	Végpont	Generáció
Embrió (megtermékenyítés utáni 2. hét)	Kikelés (% és a kikelésig eltelt idő)	F1, F2
Növendék (megtermékenyítés utáni 4. hét)	Túlélés	F1
Ivarérés előtt álló (megtermékenyítés utáni 9–10. hét)	Túlélés	F1
	Növekedés (testhossz és testtömeg)	

▼**M8**

Életszakasz	Végpont	Generáció
	Vitellogenin (mRNS vagy fehérje)	
	Másodlagos ivari jellegek (farok alatti úszó papilláris nyúlványai)	
	Külsőleg látható ivar aránya	
	1. ívásig eltelt idő	
Felnőtt (megtermékenyítés utáni 12–14. hét)	Szaporodás (fekunditás és termékenység)	F0, F1
Felnőtt (megtermékenyítés utáni 15. hét)	Túlélés	F1
	Növekedés (testhossz és testtömeg)	
	Másodlagos ivari jellegek (farok alatti úszó papilláris nyúlványai)	
	Kórszövettan (ivarmirigy, máj, vese)	

(*) Ezeket a végpontokat statisztikailag elemezni kell.

ÜTEMEZÉS

51. A fogaspontyon végzett kibővített egygenerációs vizsgálat (MEOGRT) 2. táblázatban illusztrált ütemterve bemutatja a vizsgálatot. A MEOGRT magában foglalja az F0 generáció felnőtt halainak 4 hetes kezelését, az F1 generáció 15 hetes kezelését és a második (F2) generáció expozíciós időszakát a kikelésig (megtermékenyítés utáni 2. hét). A MEOGRT során végzett tevékenységeket a 9. függelék foglalja össze.

2. táblázat

A MEOGRT során alkalmazott expozíció és végpontmérések ütemezése

MEOGRT expozíciójának és végpontméréseinek ütemezése

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Vizsgálati hét	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Életszakasz					**Embrió**					**Lárva**					**Növendék**			**Ivarérés előtt álló**	**Felnőtt**
Végpontok																			
Fekunditás	F_0														F_1				
Termékenység	F_0														F_1				
Kikelés					F_1														F_2
Túlélés						F_1						F_1						F_1	
Növekedés				F_0								F_1						F_1	
Vitellogenin												F_1							
Másodlagos ivar												F_1						F_1	
Kórszövettan																		F_1	
Vizsgálati hét	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- A kísérleti terv 7, ismétlésekből álló csoportot tartalmaz
  - 5 a vizsgálati vegyi anyaggal való kezelésekhez
  - 2 a kontroll kezelésekhez (oldószer alkalmazása esetén 4)
- Csoporton belüli kialakítás
  - 12 ismétlés a szaporodás, a felnőtt patológia és az SCC méréséhez (10–18. h)
  - 6 ismétlés a kikelés, a túlélés, a Vtg, az ivarérés előtt álló egyedek SCC-jének és a növekedés méréséhez (1–9. h)

SSC: másodlagos ivari jellegek; H: hét; Vtg: vitellogenin

▼M8

ADATOK ÉS JELENTÉS

Statisztikai elemzés

52. Mivel minden kísérleti hal esetében meghatározzák a genotípusos ivart, az adatokat a genotípusos ivar (vagyis XY hímek és XX nőstények) szerint külön kell elemezni. Ellenkező esetben az elemzések statisztikai ereje jelentősen csökken. Az adatok statisztikai elemzéséhez lehetőség szerint az „Aktuális megközelítések az ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató” (32) című OECD-dokumentumban leírt eljárásokat kell követni. A statisztikai elemzéshez a 10. függelék nyújt további útmutatást.

53. A vizsgálati tervet úgy kell kialakítani és olyan statisztikai vizsgálatokat kell választani, hogy a biológiai szempontból fontos változásokat az olyan végpontokon, ahol megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációt kell jelenteni, megfelelő statisztikai erővel lehessen észlelni (32). A releváns hatásos koncentrációk és paraméterek jegyzőkönyvezése a szabályozási kerettől függhet. Meg kell határozni a százalékos változást minden egyes végponton, amelyet fontos kimutatni vagy megbecsülni. A vizsgálatot úgy kell kialakítani, hogy ez megoldható legyen. Nem valószínű, hogy a százalékos változás minden végponton megegyezik, és az sem valószínű, hogy olyan megvalósítható kísérletet lehet tervezni, amely minden végpont tekintetében megfelel a fenti feltételeknek, tehát a kísérlet megfelelő kialakítása során azokra a végpontokra kell összpontosítani, amelyek az adott kísérlet szempontjából lényegesek. A 10. függelék statisztikai folyamatábrát és útmutatást tartalmaz, amelyek segítséget nyújtanak az adatok kezeléséhez, valamint a legmegfelelőbb statisztikai vizsgálat vagy modell kiválasztásához. Alkalmazhatók más statisztikai megközelítések is, amennyiben azok használata tudományos szempontból indokolt.

54. Szükséges a párhuzamos eredmények közti eltérések varianciaanalízissel vagy kontingenciatáblázatos módszerrel való elemzése, és az elemzés alapján a megfelelő statisztikai elemző módszerek alkalmazása. Az egyedi koncentrációszinteknél és a kontrollcsoport koncentrációszintjeinél kapott eredmények közötti összetett összehasonlítás érdekében folytonos válaszok esetén ajánlatos lefelé lépegető eljárást (pl. Jonckheere–Terpstra-féle próbát) alkalmazni. Amennyiben az adatok nem jellemezhetők monoton koncentráció-válasszal, Dunnett-féle vagy Dunn-féle próba alkalmazandó (szükség esetén az adatok megfelelő transzformálása után).

55. A fekunditás értékeléséhez az ikrákat naponta megszámlálják, az adatok azonban elemezhetők teljes ikraszámként vagy ismételt mérésként. A 10. függelék részletesen ismerteti e végpont elemzési módját. A súlyosság szerint pontszámozott kórszövettani adatok értékeléséhez kifejlesztettek egy új statisztikai próbát, a Rao–Scott Cochran–Armitage by Slices (RSCABS) trendpróbát (33).

56. A vegyi anyaggal történő kezelés során megfigyelt, a megfelelő kontrolloktól jelentős mértékben eltérő végpontokat bele kell foglalni a jelentésbe.

Adatelemzési szempontok

Érvénytelen kezelési szintek használata

57. Számos tényezőt kell figyelembe venni annak eldöntésekor, hogy az ismétlés vagy a teljes kezelés nyilvánvaló toxicitást mutat-e, melynek következtében ki kell zárni az elemzésből. A nyilvánvaló toxicitás meghatározása: a megtermékenyítés utáni 3. és 9. hét között bármelyik ismétlésben tapasztalt 4-nél több elhullás, amely technikai hibával nem magyarázható. A nyilvánvaló toxicitás egyéb tünetei közé tartoznak a vérzés, a rendellenes viselkedés, a

▼M8

rendellenes úszásminták, az anorexia és bármely egyéb betegségre utaló klinikai tünet. A toxicitás szubletális jelei tekintetében kvalitatív értékelésre lehet szükség, amelyet mindig a (csak tiszta vizet tartalmazó) hígítóvizes kontrollcsoporthoz viszonyítva kell elvégezni. Amennyiben a legmagasabb koncentrációval végzett kezelés(ek)ben nyilvánvaló toxicitás figyelhető meg, ajánlatos ezeket a kezeléseket kizárni az elemzésből.

Oldószeres kontrollok

58. Oldószer használatát csak a legvégső esetben szabad megfontolni, ha már minden egyéb kémiai bejuttatási lehetőséget számításba vettünk. Oldószer használata esetén párhuzamosan egy hígítóvizes kontrollt is kell futtatni. A vizsgálat befejezésekor értékelni kell az oldószer lehetséges hatásait. Ezt az oldószeres kontrollcsoport és a hígítóvizes kontrollcsoport statisztikai összehasonlítása útján végzik el. A legfontosabb vizsgálandó végpontok az elemzés során a növekedés meghatározói (tömeg), mivel az általános toxicitás ezeket tudja befolyásolni. Ha statisztikailag szignifikáns különbségeket mutatnak ki a hígítóvizes és az oldószeres kontrollcsoportok között e végpontok tekintetében, a legjobb szakmai megítélés alapján kell dönteni arról, hogy érvénytelennek tekinthető-e a vizsgálat. Amennyiben a két kontroll között eltérések tapasztalhatók, a vegyi anyaggal végzett kezeléseket az oldószeres kontrollal kell összevetni, kivéve ha ismert, hogy a hígítóvízzel való összehasonlítást részesítik előnyben. Amennyiben a két kontrollcsoport között nincs statisztikailag szignifikáns különbség, ajánlatos a vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezeléseket az összevont oldószeres és hígítóvizes kontrollcsoportokkal összevetni, kivéve ha ismert, hogy csak a hígítóvizes vagy csak az oldószeres kontrollcsoporttal való összehasonlítást részesítik előnyben.

Vizsgálati jegyzőkönyv

59. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag: fizikai jelleg és adott esetben a fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosító adatok..

Egy összetevőből álló anyag:

— fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

— kémiai azonosító adatok, például IUPAC- vagy CAS-név, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet, tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. (ideértve adott esetben a szervesszén-tartalmat).

Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

— amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival jellemezve.

Vizsgálati fajok:

— tudományos név, törzs (ha meghatározható), forrás és a megtermékenyített peték begyűjtésének módja, valamint a későbbi kezelés.

Vizsgálati körülmények:

— megvilágítási időszak(ok);

— vizsgálati terv (pl. a kamra mérete, az anyagok és a víz mennyisége, a vizsgálati kamrák és az ismétlések száma, az ivadékok létszáma az ismétlésekben);

▼M8

— a törzsoldat elkészítésének módszere és a vízcsere gyakorisága (az esetleg használt diszpergálószer nevét és koncentrációját meg kell adni);

— a vizsgálati vegyi anyag adagolásának módszere (például szivattyú, hígítási rendszerek);

— a módszer visszanyerési hatékonysága és a névleges vizsgálati koncentrációk, a meghatározási határ, a mért értékek átlaga és szórása a vizsgálati edényekben, az ilyen adatok megszerzésének módszerei és bizonyítékok annak alátámasztására, hogy a mérések a valódi oldatban lévő vizsgálati vegyi anyag koncentrációszintjeire vonatkoznak;

— a hígítóvíz jellemzői: pH-érték, keménység, hőmérséklet, oldottoxigén-koncentráció, maradékklór-tartalom (amennyiben mérik), teljes szerves-szén-tartalom (amennyiben mérik), szuszpendált szilárd anyagok (amennyiben mérik), a vizsgálati közeg sótartalma (amennyiben mérik) és bármely más mérési adat;

— a névleges vizsgálati koncentrációk, a mért értékek átlaga és ezek standard deviációja;

— vízminőség a tesztedényekben: pH-érték, (napi) hőmérséklet és oldottoxigén-koncentráció;

— részletes információk a táplálékról (pl. a haltápok típusa, eredete, az adagolt mennyiség és az adagolás gyakorisága).

Eredmények:

— bizonyíték arra, hogy a kontrollok teljesítették az általános érvényességi kritériumokat;

— a kontroll (és alkalmazása esetén az oldószeres kontroll) és a kezelt csoportok következő adatai: az F1 és az F2 generáció kikelése (kikelési arány és a kikelésig eltelt idő), az F1 kikelést követő túlélési aránya, az F1 növekedése (hossz és testtömeg), az F1 genotípusos ivara és ivari differenciálódása (pl. a farok alatti úszó papilláris nyúlványai és az ivarmirigy szövettana alapján meghatározott másodlagos ivari jellegek), az F1 fenotípusos ivara, az F1 másodlagos ivari jellegei (farok alatti úszó papilláris nyúlványai), az F1 *vtg* mRNS (vagy VTG fehérje) szintje, az F1 kórszövettani értékelése (ivarmirigy, máj és vese), valamint az F0 és F1 szaporodási képessége (fekunditás és termékenység); (lásd az 1. és a 2. táblázatot).

— a statisztikai elemzés során alkalmazott megközelítés (regressziós analízis vagy varianciaanalízis) és az adatok feldolgozása (az alkalmazott statisztikai vizsgálatok és modellek);

— megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve;

— megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC) minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve ($p=0,05$ értéknél); EC_x adott esetben minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve, konfidencia-intervallumok (például 90 vagy 95 %) és a számításhoz használt illesztett modell grafikonja, a koncentráció-válasz görbe meredeksége, a regressziós modell egyenlete, a modell becsült paraméterei és a becslés standard hibái;

— az e vizsgálati módszertől való eltérések, az elfogadhatósági kritériumoktól való eltérések, és a vizsgálat kimenetelére gyakorolt lehetséges hatásukkal kapcsolatos megfontolások.

▼M8

60. A végpontmérések eredményeit illetően fel kell tüntetni az átlagértékeket és az azoktól való standard deviációt (lehetőség szerint az ismétlések és a koncentrációk alapján).

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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. Elérhető a következő címen: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.), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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) E melléklet C.15., Rövid távú toxicitási vizsgálat halembriókkal és hallárvákkal című fejezete.

(22) E melléklet C.37., 21 napos halvizsgálat: Az ösztrogén- és androgénhatás, valamint az aromatázgátlás rövid távú szűrővizsgálata című fejezete.

(23) E melléklet C.41., Halak ivari fejlődésének vizsgálata című fejezete.

(24) E melléklet C.48., Halak rövid távú reprodukciós vizsgálata című fejezete.

(25) E melléklet C.47., A halak korai életszakaszára vonatkozó toxicitási vizsgálat című fejezete.

(26) E melléklet C.49., Halembriók akut toxicitási vizsgálata (FET) című fejezete.

(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). Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245-251.

(31) Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613-619.

(32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

▼M8

1. Függelék

Fogalommeghatározások

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

ELISA: enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay).

Fekunditás = ikrák száma;

Termékenység = életképes ikrák száma/fekunditás;

Villás elágazású hossz: a farok tövéig mért hossz az orrcsúcs és a farokúszó középső sugarának végpontja közötti távolság, és olyan halak esetében alkalmazandó, amelyeknél nehéz meghatározni, hogy a gerincoszlop hol ér véget (www.fishbase.org)

Kikelési arány = ivadékok/az inkubátorba helyezett embriók száma

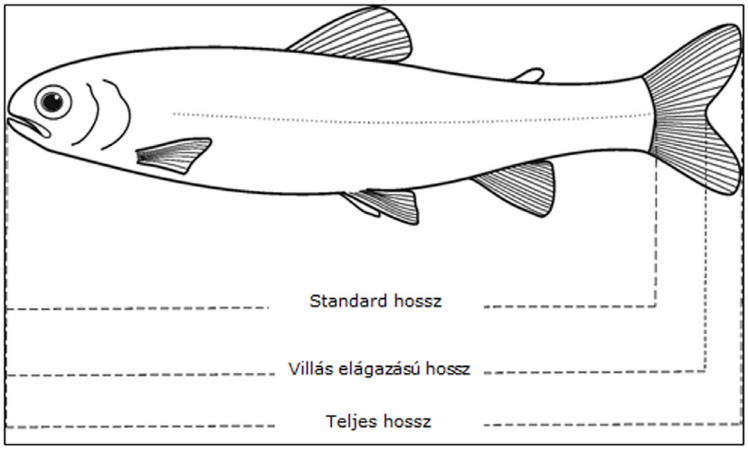
IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee (Állatgondozással és -felhasználással foglalkozó intézményi bizottság).

Standard hossz: az orrcsúcstól az utolsó csigolya poszterior végéig vagy a hipurális lemez mediolaterális részének poszterior végéig mért távolság. Leegyszerűsítve ez a mérés nem tartalmazza a farokúszó hosszát (www.fishbase.org).

Teljes hossz: az orrcsúcs és a farokúszó hosszabbik lebenyének csúcsa közötti távolság, amelyet általában a lebenyek középvonal mentén való összenyomásával mérnek. Ez egy egyenes vonalú mérés, nem követi a test görbületét (www.fishbase.org).

1. ábra

A Használt Különböző Hosszúságok Leírása



ECx: (hatásos koncentráció x % hatás eléréséhez) az a koncentráció, amely valamely hatás x %-át okozza a vizsgálati szervezetekben egy adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva. Például az EC50 az a becsült koncentráció, amely a vizsgálat valamilyen végpontja tekintetében a kitett populáció 50 %-ában okoz hatást a meghatározott expozíciós idő alatt.

Átfolyásos vizsgálat: az expozíció során a vizsgálati oldat vizsgálati rendszeren történő folyamatos áramlása mellett folytatott vizsgálat.

HPG-tengely: hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely.

▼**M8**

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Elméleti és Alkalmazott Kémia Nemzetközi Uniója).

Betelepítési arány: a halak nedvesen mért tömege egységnyi mennyiségű vízben.

Megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC): a vizsgálati vegyi anyag azon legalacsonyabb vizsgálati koncentrációja, amelynél a kontrollal összevetve még megfigyelhető a vegyi anyag statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$). Azonban az LOEC-szint feletti valamennyi vizsgálati koncentrációnak olyan ártalmas hatást kell kifejtenie, amely legalább egyenlő az LOEC-szinten megfigyelttel vagy súlyosabb annál. Amennyiben e két feltétel nem teljesíthető, akkor kimerítő magyarázatot kell adni arra, hogy hogyan történt az LOEC (és ennélfogva az NOEC) kiválasztása. Az 5. és 6. függelék útmutatást ad.

Medián letális koncentráció (LC50): a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a becslések szerint a vizsgálat időtartama alatt a vizsgálati szervezetek 50 %-ára nézve halálos.

Megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC): a közvetlenül az LOEC alatti vizsgálati koncentráció, amely – a kontrollcsoporttal való összevetésben – nem fejt ki statisztikailag szignifikáns hatást ($p < 0,05$) a meghatározott expozíciós időszak alatt.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (molekulák egyszerűsített egy sorban történő beviteli rendszere).

Betelepítési sűrűség: a halak száma egységnyi mennyiségű vízben.

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

VTG: a vitellogenin a szikben található foszfo-, lipo- és glikoproteinek prekurzora, amely alapesetben az ikrarakó fajok szexuálisan aktív nőstényeiben fordul elő.

WPF: a megtermékenyítéstől számított hetek száma.

▼**M8**

2. Függelék

AZ ELFOGADHATÓ MINŐSÉGŰ HÍGÍTÓVÍZ NÉHÁNY FONTOSABB KÉMIAI TULAJDONSÁGA

Anyag	Határkoncentráció
Szálló por	5 mg/l
Teljes szervesszén-tartalom	2 mg/l
Nem ionizált ammónia	1 µg/l
Maradék klór	10 µg/l
Szerves foszfort tartalmazó növényvédő szerek összesen	50 ng/l
Szerves klórtartalmú peszticidek + poliklórozott bifenilek	50 ng/l
Összes szerves klór	25 ng/l
Alumínium	1 µg/l
Arzén	1 µg/l
Króm	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Réz	1 µg/l
Vas	1 µg/l
Ólom	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Cink	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Higany	100 ng/l
Ezüst	100 ng/l

▼**M8**

3. Függelék

A MEOGRT VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEI

1.	Ajánlott fajok	Japán fogasponty (*Oryzias latipes*).
2.	A vizsgálat típusa	Folyamatos vízcserét biztosító átfolyásos rendszer.
3.	Vízhőmérséklet	A nominális vizsgálati hőmérséklet 25 °C. A vizsgálat teljes időtartama alatt az egyes tartályok átlaghőmérséklete 24–26 °C.
4.	A megvilágítás minősége	Fluoreszcens izzók (széles spektrum és ~150 lumen/m^2) (~150 lux).
5.	Megvilágítási időszak	16 óra fény, 8 óra sötét.
6.	Betelepítési arány	F0: 2 felnőtt/ismétlés; F1: kezdetben legfeljebb 20 ikra (embrió)/ismétlés, a kikelésnél lecsökkentve 12 embrió/ismétlésre, majd a megtermékenyítés utáni 9–10. héten 2 felnőttre (XX-XY tenyészpárra) a szaporodási fázishoz.
7.	A vizsgálati kamra minimális hasznos térfogata	1,8 l (a vizsgálati kamra mérete például: 18x9x15 cm).
8.	A vizsgálati oldatok térfogatának cseréje	Legalább napi 5 térfogatcsere és legfeljebb napi 16 térfogatcsere (vagy 20 ml/perc áramlás).
9.	A vizsgált élőlények kora a vizsgálat kezdetén	F0: A megtermékenyítéstől számítva legalább 12, legfeljebb 16 hét.
10.	Élőlények ismétlésenkénti száma	F0: 2 hal (egy hímből és egy nőstényből álló pár); F1: ismétlésenként legfeljebb 20 (F0 és F1 tenyészpároktól származó) hal (ikra).
11.	Kezelések száma	5 vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelés plusz a megfelelő kontroll(ok).
12.	Kezelésenkénti ismétlések száma	A vizsgálati vegyi anyag esetében legalább 6 ismétlés kezelésenként, a kontroll – és ha alkalmazzák, az oldószeres kontroll – esetében legalább 12 ismétlés (az F1 generáció reprodukciós fázisában az ismétlések számát megduplázzák).
13.	Élőlények száma vizsgálatonként	Az F0 generációban legalább 84 hal, az F1 generációban 504 hal. (Oldószeres kontroll végzése esetén 108 hal az F0 generációban és 648 hal az F1 generációban). A számlálás egysége a szabad embrió utáni életszakaszban lévő egyedek.
14.	Etetési rend	A halak *ad libitum* etethetők *Artemia* sórákkal (24 órás naupliusszal), szükség esetén kereskedelmi forgalomban kapható pelyhesített haleledellel kiegészítve (a megbízható szaporodást lehetővé tévő, megfelelő növekedést és fejlődést biztosító etetési rend egy példáját az 5. függelék ismerteti).

▼**M8**

15. Levegőztetés	Nincs, kivéve ha az oldott oxigén koncentrációja megközelíti a < 60 %-os levegőtelítettségi értéket.
16. Hígítóvíz	Tiszta felszíni víz, kútvíz, mesterséges víz vagy klórmentesített csapvíz.
17. Expozíciós időtartam	Alapvetően 19 hét (az F0 generációtól az F2 generáció kikeléséig).
18. Biológiai végpontok (elsődleges)	Kikelési arány (F1 és F2 generáció); túlélés (F1, kikeléstől a megtermékenyítés utáni 4. hétig (lárvakor vége/növendékkor eleje), a megtermékenyítés utáni 4. és 9. (vagy 10.) hét között (növendékkor elejétől az ivarérés előtti korig) és a megtermékenyítés utáni 9. és 15, hét között (ivarérés előtti kortól a felnőttek elpusztításáig)); növekedés (F1, hossz és tömeg a megtermékenyítés utáni 9. és 15. héten); másodlagos ivari jellegek (F1, farok alatti úszó papilláris nyúlványai a megtermékenyítés utáni 9. és 15. héten); vitellogenin (F1, *vtg* mRNS vagy VTG fehérje a megtermékenyítés utáni 15. héten); fenotípusos ivar (F1, ivarmirigy szövettani vizsgálatával a megtermékenyítés utáni 15. héten); szaporodás (F0 és F1, fekunditás és termékenység mérése 21 napig); az ívásig eltelt idő (F1); és kórszövettan (F1, ivarmirigy, máj és vese a megtermékenyítés utáni 15. héten).
19. A vizsgálat érvényességi kritériumai	Az oldott oxigén a levegőtelítettségi érték legalább 60 %-a; a vizsgálat teljes időtartama alatt az átlagos vízhőmérséklet 24–26 °C; a kontroll(ok)ban a nőstények legalább 65 %-a sikeresen szaporodik; a kontroll(ok)ban az átlagos napi fekunditás legalább 20 ikra; a kontrollokban a kikelési arány (átlagosan) eléri a 80 %-ot (mind az F1, mind az F2 generációban); a kontrollokban (F1) a kikeléstől a megtermékenyítés utáni 3. hétig a túlélés átlagosan legalább 80 % és a megtermékenyítés utáni 3. héttől a generáció egyedeinek elpusztításáig átlagosan legalább 90 %, a vizsgálati vegyi anyag oldatban lévő koncentrációit az átlagos mért értékek ±20 %-os tartományán belül sikerült tartani.

▼M8

4. függelék

IRÁNYMUTATÁS A TIPIKUS KONTROLLÉRTÉKEKHEZ

Ezeket a kontrollértékeket korlátozott számú validálási tanulmány alapján határozták meg, ezért a további tapasztalatok fényében módosításra kerülhetnek.

Növekedés

A megtermékenyítés utáni 9. (vagy 10.) és 15. héten a mintavételhez használt minden halnak megmérik a testtömegét és a hosszát. E protokoll betartása esetén a megtermékenyítés utáni 9. héten a hímek várt nedves tömege 85–145 mg, míg a nőstényeké 95–150 mg. A megtermékenyítés utáni 15. héten a hímek várt tömege 250–330 mg, a nőstényeké 280–350 mg. Bár az egyes halak testtömege jelentősen eltérhet a megadott tartománytól, ha a kontrollcsoport átlagos testtömege nagy mértékben kívül esik ezeken a tartományokon, különösen ha alacsonyabb, az a táplálással, hőmérséklet-szabályozással vagy vízminőséggel kapcsolatos problémára, betegségre, vagy e tényezők bármely kombinációjára utal.

Kikelés

A kontrollcsoportokban a kikelési sikeresség általában 90 % körül alakul, ugyanakkor esetenként lecsökkenhet akár 80 %-ig is. A 75 %-nál alacsonyabb kikelési sikeresség azt jelezheti, hogy nem mozgatják megfelelő mértékben a fejlődő ikrákat, vagy nem kezelik őket kellő odafigyeléssel, például nem távolítják el időben az elpusztult ikrákat, ami gombás fertőzéshez vezet.

Túlélés

A kontrollcsoportokban a túlélési arány a kikeléstől a megtermékenyítés utáni 3. hétig és ezt követően általában 90 % vagy magasabb, de nem nyugtalanító az sem, ha a korai életszakaszokban a kontrollok túlélési aránya 80 %-ig csökken. A kontrollcsoportok 80 %-nál alacsonyabb túlélési aránya aggodalomra adna okot és arra utalhat, hogy az akváriumok elégtelen tisztítása miatt betegségből vagy az alacsony oldottoxigén-tartalom okozta fulladásból kifolyólag pusztulnak a lárvák. A halálozás további okai lehetnek a tartály tisztítása során a lárvákat ért sérülés és a tartály vízelvezető rendszerének tulajdonítható lárvapusztulás.

Vitellogenin gén

Bár a *vitellogenin* (*vtg*) gén – génkópiák/teljes mRNS ng-jában kifejezett – abszolút szintjei az alkalmazott eljárások vagy műszerek miatt jelentősen eltérhetnek az egyes laboratóriumok között, a *vtg* arányának a kontrollcsoport nőstényeiben 200-szor nagyobbnak kell lennie, mint a hímekben. Nem szokatlanok az 1 000–2 000-szeres értékek, ugyanakkor a 200-szorosnál alacsonyabb arányszámok gyanúsak és arra utalhatnak, hogy problémát okozott a minta fertőzöttsége, az alkalmazott eljárás és/vagy reagens.

Másodlagos ivari jellegek

A hímek esetében a másodlagos ivari jellegek normál tartománya, amelyet a farok alatti úszó papilláris nyúlványainak úszósugaraiban található összes szegmens száma alapján határoznak meg, a megtermékenyítés utáni 9–10. héten 40–80 szegmens. A megtermékenyítés utáni 15. héten a kontrollcsoport hímjeinél ez a tartomány 80–120 körül alakul, a nőstényeknél pedig 0. Ismeretlen okokból kifolyólag bizonyos hím egyedeknél ritkán előfordul, hogy a megtermékenyítés utáni 9. héten nincs papilláris nyúlványuk, de mivel a megtermékenyítés utáni 15. hétre minden kontroll hímen megjelennek papilláris nyúlványok, valószínűleg késleltetett fejlődésről van szó. Amennyiben a kontrollcsoport nőstényeinél megfigyelhetők papilláris nyúlványok, az arra utal, hogy a populációban vannak XX hímek.

▼**M8**

XX hímek

Az XX hímek normál háttérbeli előfordulása a tenyészetekben 25 °C-on körülbelül 4 % vagy kevesebb, előfordulásuk a hőmérséklet emelkedésével párhuzamosan növekszik. Intézkedéseket kell tenni annak érdekében, hogy a populációban minél alacsonyabb legyen az XX hímek aránya. Miután az XX hímek előfordulása részben a genetikára vezethető vissza, ezért örökölhető, a tenyészállomány ellenőrzésével és annak biztosításával, hogy az XX hímek nem kerülnek felhasználásra a tenyészállomány szaporításához, hatékonyan csökkenthető az XX hímek populáción belüli előfordulása.

Ívási aktivitás

A fekunditás felmérését megelőzően a kontroll ismétlésekben naponta ellenőrizni kell az ívási aktivitást. Az ívási aktivitásról a kontrollcsoportban lévő tenyészpárok számának vizuális felmérésével lehet megbizonyosodni. A megtermékenyítés utáni 12–14. héten a kontrollcsoport legtöbb párjának már ívnia kell. Ha ebben az időszakban alacsony az ívó párok száma, az a halak egészségét, ivarérettségét vagy jólétét érintő potenciális problémákat jelez.

Fekunditás

Az egészséges, jól táplált, megtermékenyítés utáni 12–14. hétben járó fogaspontyok naponta ívnak, amelynek során napi 15–50 ikrát termelnek. Az ajánlott 24 kontrollként szolgáló tenyészpárból 16-nak (> 65 %) naponta és tenyészpáronként több mint 20 ikrát kell leraknia, de a napi ikramennyiség akár 40 körüli is lehet. Ennél kevesebb ikra arra utalhat, hogy a tenyészpárok nem ivarérettek, rosszul tápláltak vagy betegek.

Termékenység

A kontrollcsoport ívó párjainál a megtermékenyített ikrák aránya jellemzően körülbelül 90 %, de esetenként mérnek 95 % körüli vagy afeletti arányszámokat is. A kontrollcsoport ikráinak 80 %-nál alacsonyabb termékenységi arányai gyanúsak, és az egyedek betegségét vagy a tenyésztési körülmények ideálistól való elmaradását jelezhetik.

▼M8

5. függelék

PÉLDA ETETÉSI RENDRE

A megbízható szaporodást elősegítő, megfelelő növekedést és fejlődést biztosító etetési rend egy példáját az 1. táblázat ismerteti. Az etetési rendtől való eltérések elfogadhatók, de ajánlatos teszteléssel ellenőrizni, hogy elfogadható növekedést és szaporodást eredményeznek-e. A javasolt etetési rend betartásához a vizsgálatot megelőzően meg kell határozni a sóráknak a folyékony sórák egy egységére eső száraz tömegét. Ehhez lemérnek egy meghatározott térfogatú folyékony sórákot, amelyet előzetesen lemért tálba helyeztek, és 60 °C-on 24 órán keresztül szárítottak. A folyékony sórák sótartalmának tömegét úgy lehet megállapítani, hogy a folyékony sórákhoz használt sóoldattal azonos és megegyező mennyiségű sóoldatot szintén kiszárítanak, lemérnek, majd tömegét levonják a kiszárított folyékony sórák tömegéből. Alternatív megoldásként a sórákot kiszárítás előtt leszűrhetik és desztillált vízzel átöblíthetik, így nem szükséges lemérni a „só vakoldat” tömegét. Az így kapott információval a sórák táblázatban feltüntetett száraz tömege alapján meghatározható a folyékony sórák halak etetéséhez használandó mennyisége. Ezenfelül javasolt a folyékony sórák alikvotjainak heti mérésével ellenőrizni az etetéshez használt sórák száraz tömegét.

1. táblázat

Az etetési rend példája

Időpont (kikelés utáni nap)	Sórák (mg száraz tömeg/hal/nap)
1. nap	0,5
2. nap	0,5
3. nap	0,6
4. nap	0,7
5. nap	0,8
6. nap	1,0
7. nap	1,3
8. nap	1,7
9. nap	2,2
10. nap	2,8
11. nap	3,5
12. nap	4,2
13. nap	4,5
14. nap	4,8
15. nap	5,2
16–21. nap	5,6

▼**M8**

Időpont (kikelés utáni nap)	Sórák (mg száraz tömeg/hal/nap)
4. hét	7,7
5. hét	9,0
6. hét	11,0
7. hét	13,5
8. hét – elpusztítás	22,5

▼**M8**

6. függelék

Ikrakeltető Inkubációs Kamra Példája

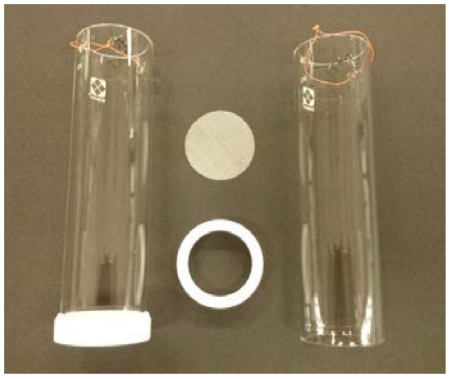
A példa





Ez az inkubátor egy bemetszett üveg centrifugacsőből áll, a csöveket egy rozsdamentes acél tartóhüvely köti össze egymással, és a centrifugacső felső csavaros kupakja tartja a helyükön. Egy, a kupakon áthaladó kis méretű üveg vagy rozsdamentes acél cső a centrifugacső kerek aljának közelében elhelyezkedve légbuborékok óvatos bejuttatásával lebegteti az ikrákat, csökkentve az ikrák közötti szaprofita gombás fertőzések terjedését, ugyanakkor megkönnyíti a vegyi anyag inkubátor és tárolótartály közötti cseréjét.

B példa



▼**M8**



Ez az inkubátor egy (5 cm átmérőjű és 10 cm magas) üveg hengertestből és rozsdamentes dróthálóból (0,25 φ és 32 hálószem) áll, ez utóbbi egy PTFE gyűrűvel csatlakozik a hengertest aljához. Az inkubátorokat az emelőrúdnál fogva függesztik fel és rögzítik a tartályokhoz, és a fogaspontyikráknak megfelelő ciklusban (körülbelül 4 másodpercenként) függőlegesen rázatják őket (mintegy 5 cm-es kilengéssel).

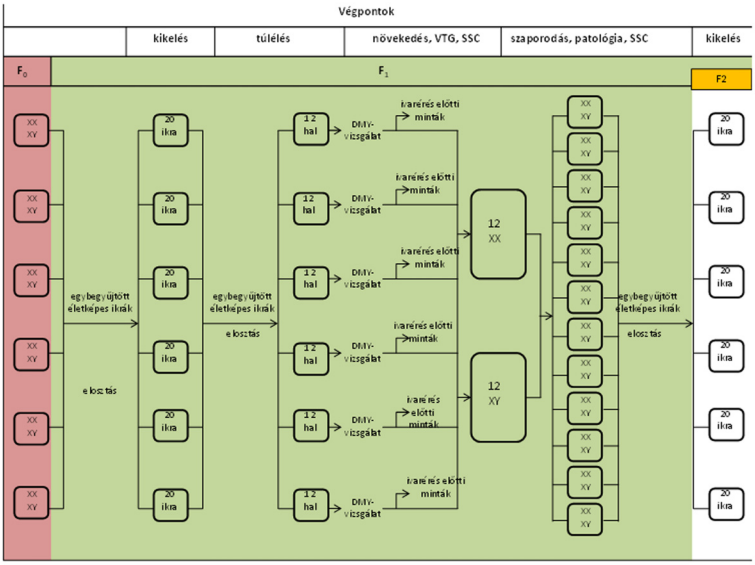
▼M8

7. függelék

SEMATIKUS ÁBRA A MEOGRT VIZSGÁLATI MÓDSZERBEN ALKALMAZOTT ISMÉTLÉSEK EGYEDEINEK EGYBEGYŰJTÉSÉHEZ ÉS SZÉTOSZTÁSÁHOZ

1. ábra

Az ismétlések egyedeinek egybegyűjtése és szétosztása a MEOGRT során. A számok egy kezelésre vagy egy ½ kontrollvizsgálatra vonatkoznak. A halak egybegyűjtése miatt az egyes ismétlések a vizsgálat teljes ideje alatt nem ugyanazokat az egyedeket tartalmazzák. Az ikra kifejezés az életképes, megtermékenyített ikrákra (vagyis az embriókra) utal.



Kezelések és ismétlések

A vizsgálati módszer technikai tisztaságú anyagok használatával végzett, öt vizsgálati vegyi anyaggal való kezelést és egy negatív kontrollt javasol. A MEOGRT során a kezelésenkénti ismétlések száma változó, a kontrollvizsgálatban pedig kétszer annyi ismétlést használnak, mint egy vizsgálati vegyi anyaggal történő kezelésben. Az F0 generáció esetében a vizsgálati vegyi anyaggal zajló kezelésnél hat ismétlést, a negatív kontrollvizsgálatban pedig 12 ismétlést használnak. Oldószerek használata nem ajánlott, ha mégis sor kerül használatukra, a MEOGRT jelentésébe bele kell foglalni az oldószer alkalmazásának és választásának indokolását. Oldószer használata esetén ráadásul két típusú kontrollvizsgálatra van szükség: a) oldószeres kontrollra és b) negatív kontrollra. E két kontrollcsoport mindegyikének a MEOGRT vizsgálat minden szakaszában tartalmaznia kell az ismétlések teljes számát. Az ismétlések fentiekben ismertetett száma változatlan marad a kísérleti élőlények F1 generációjának teljes fejlődése alatt (és az F2 generáció fejlődése során a kikelésig). Ugyanakkor a felnőtt stádiumban, amikor az F1 generáció tenyészpárjait kialakítják, optimális esetben kezelésenként megduplázzák a tenyészpárokkal zajló ismétlések számát; ezért a vizsgálati vegyi anyaggal történő egyes kezelések során legfeljebb 12 párt (vagyis ismétlést), míg a kontrollcsoportban 24 párt vizsgálnak (és szükség szerint további 24 párt az oldószeres kontrollban). Az F1 generáció párjaitól származó embriók kikelését ugyanannyi ismétlésben mérik, mint az F0 generáció párjaitól származó embriók esetében, vagyis vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelést hat ismétlésben végeznek, és 12 ismétlést vizsgálnak a kontrollcsoport(ok)ban.

▼M8

8. függelék

A FAROK ALATTI ÚSZÓ PAPILLÁRIS NYÚLVÁNYAINAK MEGSZÁMLÁLÁSA

Főbb anyagok és reagensek

— Preparálómikroszkóp (opcionálisan fényképezőgéppel felszerelve)

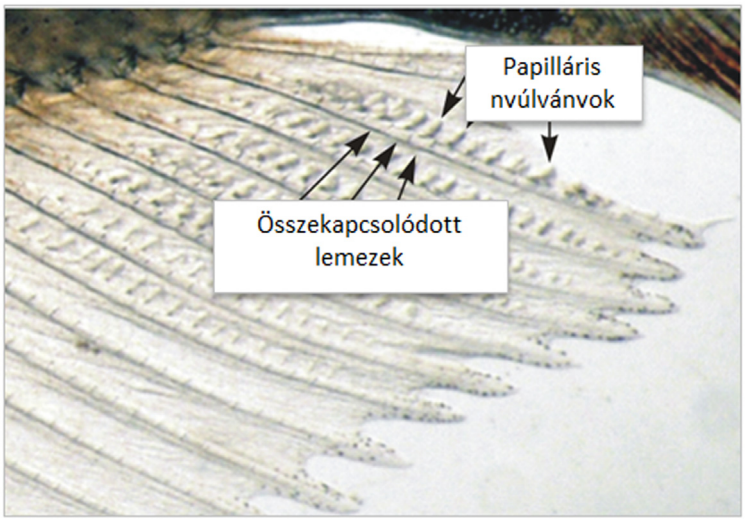
— Fixálószer (pl. Davidson-féle, a Bouin-féle használata nem ajánlott), ha nem felvétel alapján végzik a számlálást

Eljárások

A boncolást követően a farok alatti úszóról felvételt kell készíteni, ez lehetővé teszi a farok alatti úszó papilláris nyúlványainak kényelmes megszámlálását. Bár a felvételkészítés az ajánlott módszer, a farok alatti úszó körülbelül 1 percig fixálható Davidson-féle vagy más megfelelő fixálószerben. A fixálás során a farok alatti úszót síkban kell tartani, mert ez megkönnyíti a papilláris nyúlványok megszámlálását. A hal teste a farok alatti úszóval együtt vizsgálatukig tárolható Davidson-féle vagy más megfelelő fixálószerben. Ezt követőn megszámlálható az összekapcsolódott lemez hátsó szélénél kiálló papilláris nyúlványokat tartalmazó összekapcsolt lemezek száma (lásd az **1. ábrát**).

1. ábra

Farok alatti úszó papilláris nyúlványai



▼M8

9. függelék

A MEOGRT RÉSZLETES ÜTEMEZÉSE

1–3. vizsgálati hét (F0)

A kiválasztási kritériumoknak (lásd a 16–20. pontot) megfelelő F0 generációs ívó halakat három hétig kezelik, amelynek során a fejlődésben lévő ivarsejteket és ivari szöveteket kiteszik a vizsgálati vegyi anyagnak. Mindegyik tartály (ismétlés) egyetlen tenyészpárt (XX nőstény-XY hím tenyészpárt) tartalmaz. A lerakott ikrákat az 1. vizsgálati naptól kezdve 21 egymást követő napon át begyűjtik, megszámlálják és meghatározzák, hogy megtermékenyültek-e.

4. vizsgálati hét (F0 és F1)

Törekedni kell arra, hogy a megtermékenyített és életképes ikrákat (embriókat) egy napon belül gyűjtsék össze; elégtelen embriószám esetén azonban két napon keresztül is gyűjthetik az embriókat. Amennyiben az embriókat két napon át gyűjtik, az egyes kezeléseken belül az első napon begyűjtött embriókat egybegyűjtik a második napon begyűjtött embriókkal. Ezt követően az egyes kezelések során egybegyűjtött összes embriót huszasával véletlenszerűen elosztják az egyes inkubátorokba (ismétlésekbe). A megtermékenyített ikrák (embriók) mortalitását naponta ellenőrizni és rögzíteni kell. Az elpusztult ikrákat eltávolítják az inkubátorokból (a megtermékenyített ikrák elpusztulását jelzi – különösen a korai szakaszokban – az áttetszőség jelentős csökkenése és színbeli elváltozás, amit a fehérjék koagulációja és/vagy kicsapódása okoz, ami fehér opálos színt eredményez; OECD 2010).

Megjegyzés: ha valamely kezelés esetében szükség van az ikrák második napon történő begyűjtésére, minden kezelés során (a kontrollvizsgálatokban is) követni kell ezt az eljárást. Amennyiben valamely kezelésben a második begyűjtési napot követően sincs elegendő számú embrió ahhoz, hogy az inkubátorokba 20 embriót lehessen telepíteni, akkor az adott kezelésen belül a betelepített embriók számát inkubátoronként 15-re kell csökkenteni. Ha nem áll rendelkezésre kellő számú embrió ahhoz, hogy az egyes inkubátorokba 15 embriót lehessen telepíteni, akkor csökkenteni kell az inkubátorok számát, amíg inkubátoronként 15 embriót el lehet helyezni. Emellett további tenyészpárok adhatók hozzá az F0 generáció kezelési és kontrollcsoportjaihoz, hogy több ikrát termeljenek az ismétlésenként javasolt 20 ikra eléréséhez.

A 24. vizsgálati napon az F0 generáció tenyészpárjait kíméletesen leölik, az egyedek tömegét és hosszát feljegyzik. Az F1 generáció újbóli létrehozása érdekében szükség esetén az F0 generáció tenyészpárjai további 1–2 napig fenntarthatók.

5-6. vizsgálati hét (F1)

A kikelés várható kezdete előtt egy-két nappal a kikelés elősegítése érdekében le kell állítani vagy csökkenteni kell az inkubált ikrák mozgatását. Ahogy az embriók kikelnek az egyes napokon, az ivadékokat kezelésenként egybegyűjtik, és szisztematikusan szétosztják az adott kezelésen belüli, lárvák elhelyezésére szolgáló tartályok (ismétlések) között, legfeljebb 12 ivadékot telepítve a tartályokba. Ehhez véletlenszerűen kiválasztják az ivadékokat, és válogatás nélkül sorban elhelyezik őket az ismétlésekben, meghatározott sorrendben haladva az adott kezelés ismétlései között, amíg a kezelés összes ismétlésébe be nem telepítettek 12 ivadékot. Amennyiben nincs elég ivadék az összes ismétlés feltöltéséhez, akkor arra kell törekedni, hogy a lehető legtöbb ismétlés tartalmazzon 12 ivadékot az F1 fázis megkezdéséhez.

Azokat az ikrákat, amelyek nem keltek ki a kontroll átlagos kikelési napjának kétszereséig, életképtelennek tekintik és eltávolítják. Az ivadékok számát feljegyzik, és minden ismétlés esetében meghatározzák a kikelés sikerességét (a kikelési arányt).

▼M8

7-11. vizsgálati hét (F1)

A lárvák túlélését minden ismétlés tekintetében naponta ellenőrzik és rögzítik. A 43. vizsgálati napon feljegyzik az egyes ismétlések túlélő halainak számát, valamint a tartályba helyezett ivadékok induló létszámát (nominálisan tizenkettő). Ez teszi lehetővé a túlélési arány meghatározását a kikeléstől az ivarérés előtti állapotig.

12. vizsgálati hét (F1)

A 78–85. vizsgálati napon az egyedek genotípusos ivarának meghatározásához kis méretű mintát vesznek minden hal farokúszójából (úszók bevágása). Az így kapott információk alapján alakítják ki a tenyészpárokat.

Az egyedek genotípusos ivarának megállapítását követő három napon belül véletlenszerűen létrehoznak 12 tenyészpárt az egyes kezelésekhez és 24 tenyészpárt az egyes kontrollvizsgálatokhoz. Minden ismétlésből véletlenszerűen kiválasztanak két XX és két XY halat, ivar szerint egybegyűjtik őket, majd véletlenszerűen tenyészpárokat (XX-XY párokat) alakítanak belőlük. A vegyi anyaggal végzett kezeléshez legalább 12, a kontrollvizsgálathoz legalább 24 ismétlést hoznak létre, ismétlésenként egy-egy tenyészpárral. Amennyiben valamely ismétlésben nem áll rendelkezésre két XX vagy két XY példány a halak egybegyűjtéséhez, akkor a kezeléshez tartozó többi ismétlésből kell biztosítani a megfelelő genotípusos ivarú halakat.

A fennmaradó halakat (ismétlésenként legfeljebb 8-at) humánus módon leölik, és mintákat vesznek tőlük a különböző ivarérés előtti végpontok értékeléséhez. Az ivarérés előtti halakból származó minták *dmy* génre vonatkozó adatait (XX vagy XY) megőrzik, mert ezáltal biztosítható, hogy a végpontokra vonatkozó adatokat az egyes halak genetikus ivarával összefüggésben értelmezzék.

13-14. vizsgálati hét (F1)

A kezelés az ivarérés előtti tenyészpárok felnőtté válása alatt is folytatódik. A vizsgálati 98. napján (vagyis az ikrák begyűjtésének kezdete előtti napon) az ikrákat eltávolítják az akváriumokból és a nőstényekről.

15-17. vizsgálati hét (F1)

A lerakott ikrákat 21 egymást követő napon át naponta begyűjtik minden ismétlésből, és értékelik fekunditás és termékenység szempontjából.

18. vizsgálati hét (a 4. vizsgálati hét ismétlése) (F1 és F2)

A 120. vizsgálati nap reggelén minden tartályból (ismétlésből) begyűjtik az ikrákat. A begyűjtött ikrákat értékelik, majd az összes tenyészpár megtermékenyített ikráit kezelésenként egybegyűjtik (az ikrafonalat eltávolítják), és szisztematikusan szétosztják az ikrakeltető inkubációs kamrákba, legfeljebb 20 megtermékenyített ikrát telepítve egy inkubátorba. A inkubátorok elhelyezhetők különálló, az egyes kezelésekhez felállított inkubátor tartályokba, vagy azokba a tartályba, amely a kikelést követően otthont adnak majd a kikelt lárváknak. Törekedni kell arra, hogy az embriókat egy napon belül gyűjtsék össze; elégtelen embriószám esetén azonban két napon keresztül is gyűjthetik őket. Amennyiben az embriókat két napon keresztül gyűjtik be, az egyes kezeléseken belül az első napon begyűjtött embriókat egybegyűjtik a második napon begyűjtött embriókkal. Ezt követően az egyes kezelések során egybegyűjtött összes embriót huszasával véletlenszerűen elosztják az egyes inkubátorokba (ismétlésekbe). Megjegyzés: ha valamely kezelés esetében szükség van az ikrák második napon történő begyűjtésére, minden kezelés során (a kontrollvizsgálatokban is) követni kell ezt az eljárást. Amennyiben valamely kezelés esetén a második

▼M8

begyűjtési napot követően sincs elegendő számú embrió ahhoz, hogy az inkubátorokba 20 embriót lehessen telepíteni, az adott kezelésen belül a betelepített embriók számát inkubátoronként 15-re kell csökkenteni. Ha nem áll rendelkezésre kellő számú embrió ahhoz, hogy az egyes inkubátorokba 15 embriót lehessen telepíteni, akkor csökkenteni kell az inkubátorok számát, amíg inkubátoronként 15 embriót el lehet helyezni.

A 121. vizsgálati napon (vagy a 122. vizsgálati napon, ha biztosítani kívánják az F2 generáció megfelelő indulását) az F1 generáció tenyészpárjait kíméletesen leölik és a felnőtt végpontok szerint elemzik. Az F2 generáció újbóli létrehozása érdekében szükség esetén az F1 generáció tenyészpárjai további 1–2 napig fenntarthatók.

19-20. vizsgálati hét (F2)

A kikelés várható kezdete előtt egy-két nappal a kikelés elősegítése érdekében le kell állítani vagy csökkenteni kell az inkubált ikrák mozgatását. Amennyiben a vizsgálatot az F2 generáció kikelését követően lezárják, az ivadékokat minden nap megszámlálják és eltávolítják. (Azokat az embriókat, amelyek nem keltek ki a meghosszabbított inkubációs idő alatt, vagyis a kontroll átlagos kikelési napjának kétszereséig, életképtelennek tekintik).

▼M8

10. függelék

STATISZTIKAI ELEMZÉS

A MEOGRT során létrehozott biológiai adatok típusai nem csak e vizsgálatra jellemzőek, és a patológiai adatok kivételével számos megfelelő statisztikai módszertant dolgoztak ki a hasonló adatok helyes elemzésére attól függően, hogy milyen jellegű adatok állnak rendelkezésre, ideértve a normál eloszlást és a szóródáshomogenitást, illetve azt, hogy a tanulmány kialakításából fakadóan hipotézisvizsgálat vagy regressziós analízis, parametrikus vagy nem paraméteres vizsgálatok alkalmazhatók. Általánosan érvényes, hogy a javasolt statisztikai elemzések az OECD ökotoxicitási adatokra vonatkozó ajánlásait követik (OECD 2006), a 2. ábra pedig bemutatja a MEOGRT adatelemzésével kapcsolatos döntési folyamatábrát.

Az adatbázis feltételezhetően többnyire monoton válaszokkal jellemezhető. Emellett mérlegelni kell, hogy egyoldalú vagy kétoldalú statisztikai vizsgálatot érdemes végezni. Amennyiben nem lehet biológiai érvekkel alátámasztani az egyoldalú vizsgálat alkalmatlanságát, akkor javasolt egyoldalú vizsgálatot végezni. Az alábbi rész ajánlást tartalmaz bizonyos statisztikai vizsgálatok használatára, ha azonban léteznek megfelelőbb és/vagy hatékonyabb statisztikai módszerek a MEOGRT során létrehozott egyedi adatok elemzésére, akkor azokat kell használni, hogy ki lehessen aknázni az általuk biztosított előnyöket.

A MEOGRT során kapott adatokat genotípusos ivaronként kell elemezni. A fordított ivarú halak (XX hímek vagy XY nőstények) adatainak elemzésére két stratégia alapján kerülhet sor: 1) a fordított ivarú halakról a vizsgálat során szerzett valamennyi adat törlése, az egyes ismétlésekben előforduló ivarváltás gyakoriságára vonatkozó adatokat kivéve; 2) a fordított ivarú halakról gyűjtött adatok megtartása és genotípus szerinti elemzése.

Kórszövettani adatok

A jelentésben súlyosság szerint pontszámozott kórszövettani adatok értékelését egy újonnan kifejlesztett statisztikai eljárás, a Rao–Scott Cochran–Armitage by Slices (RSCABS) trendpróba alapján végzik (Green és munkatársai, 2014). A *Rao-Scott*-féle módosítás megtartja a vegyi anyaggal kezelt ismétlések adatait; a *by Slices* eljárás pedig figyelembe veszi azt a biológiai elvárást, hogy a kezelés során alkalmazott koncentrációk növelése magával vonja a súlyossági pontszámok emelkedését. Az RSCABS eredménye minden diagnózis esetében meghatározza, hogy a kontrollokhoz képest melyik kezelésnél gyakoribbak a patológiás elváltozások, és azok milyen súlyossági szintet képviselnek.

Fekunditási adatok

A fekunditási adatok elemzése lefelé lépegető Jonckheere–Terpstra-féle próbával vagy Williams-féle próbával történik, amelynek során meghatározzák a kezelés által kiváltott hatásokat, ha az adatok összhangban vannak egy monoton jellegű koncentráció-válasszal. A lefelé lépegető próbák során minden összevetést a 0,05-ös szignifikanciaszinten végeznek el, és az eredményt nem igazítják ki az összevetések száma alapján. A várakozások szerint az adatok monoton koncentráció-válasszal jellemezhetők, ez ellenőrizhető az adatok szemrevételezésével, illetve úgy is, hogy az adatok rangsorba rendezését követően létrehozzák a kezelés átlagértékeinek lineáris vagy kvadratikus kontrasztjait. Ha a kvadratikus kontraszt szignifikáns, a lineáris kontraszt pedig nem az, a trendpróba lezárható. Ellenkező esetben, ha az adatok normál eloszlásúak homogén szórással, a kezelés által kiváltott hatásokat a Dunnett-féle próbával határozzák meg. Amennyiben ezek a feltételek nem teljesülnek, a Dunn-féle próba Bonferronni–Holm módosítását alkalmazzák. Az említett próbákat általános F-próbától vagy Kruskal–Wallis-féle próbától függetlenül kell elvégezni. Minderről további részletek az OECD 2006 dokumentumban találhatók.

▼M8

Más módszerek is használhatók, például általánosított lineáris modellek Poisson-hibaeloszlással az ikrák számlálásához (az adatok transzformálása nélkül), ha statisztikailag indokolható (Cameron és Trividi, 2013). Alternatív megközelítés alkalmazása esetén statisztikai tanácsadás igénybevétele ajánlott.

Napi ikraszámlálás egy generáción belül

Az ANOVA modell a következő képleten alapul: Y=Idő*Idő+Kezelés + *Kezelés + Idő*Kezelés + *Idő*Kezelés, az Ismétlés(Generáció*Kezelés) és az Idő*Ismétlés(Kezelés) véletlen hatással, amely lehetővé teszi mindkét típusú egyenlőtlen varianciakomponens generációkon keresztüli elemzését. A képletben az Idő az ikraszámlálás gyakoriságára utal (pl. napi vagy heti). Ez egy ismételt méréseken alapuló elemzés, az egy adott ismétlésre vonatkozó megfigyelések között korrelációk jelentik azt, hogy az adatok ismételt mérésből származnak.

A kezelés fő hatásait a Dunnett-féle (vagy Dunnett-Hsu-féle) próbával vizsgálják, amely az összevetések száma szerint kiigazítja az eredményt. A generáció vagy az idő okozta fő hatást ki kell igazítani, mivel e két tényező esetében nem áll rendelkezésre kontrollszint, és az egyes szignifikanciaszinteken minden pár összevetése érdekes lehet. E két fő hatás tekintetében ha az F-próbával vizsgált fő hatás szignifikáns 0,05-ös szinten, akkor az adott tényező különböző szignifikanciaszinteken történő páronkénti összevetése a 0,05-ös szinten további kiigazítás nélkül vizsgálható.

Mivel a modell két és három tényező kölcsönhatását vizsgálja, előfordulhat, hogy például az idő fő hatása nem lesz szignifikáns, pedig az idő jelentősen befolyásolja az eredményeket. Ha tehát egy két vagy három tényezős kölcsönhatás, amelynek egyik tényezője az idő, 0,05-ös szinten szignifikáns, akkor elfogadható a különböző időszintek 0,05-ös szignifikanciaszinten történő korrekció nélküli összevetése.

Azután F-próbákkal mérhető a kezelés adott időn belüli szignifikanciája, ezek az úgynevezett F-próbarészek az ANOVA-táblázatban. Ha például az F1 generáció 12. idősávon belüli kezelését magában foglaló F-próbarész szignifikáns a 0,05-ös szinten, akkor az F1 generáció 12. idősávon belüli kezelésének páronkénti összevetése a 0,05-ös szinten további kiigazítás nélkül vizsgálható. Hasonló megállapítások vonatkoznak azokra a vizsgálatokra, amelyek az időt mérik az F1 generációval és a kezeléssel való összefüggésben, illetve a generációt az idővel és a kezeléssel való összefüggésben.

Végezetül pedig a fenti kategóriák egyikébe sem sorolható összehasonlítások esetén az összevetéseket a p-értékek Bonferroni–Holm-féle korrekciója szerint kell kiigazítani. Az ilyen jellegű modellek elemzéséről további részletekkel Hocking (1985), valamint Hochberg és Tamhane (1987) szolgál.

Alternatív megoldásként a nyers adatokat feljegyzik és a vizsgálati jegyzőkönyvben ismétlésenkénti napi fekunditásként (ikraszámként) tüntetik fel. Ezután kiszámítják az ismétlések nyers adatainak átlagát, majd négyzetgyök transzformációt alkalmaznak. Ezt követően az ismétlések transzformált átlagértékén egyoldali varianciaanalízist (ANOVA) végeznek, majd meghatározzák a Dunnett-féle kontrasztokat. Szintén hasznos lehet az egyes kezelések és/vagy ismétlések fekunditási adatainak vizuális ellenőrzése egy, az adatokat az idő függvényében ábrázoló szórásdiagrammal. Ez lehetővé teszi az idővel jelentkező potenciális hatások informális értékelését.

Minden egyéb biológiai adat

A statisztikai elemzések abból az alapfeltevésből indulnak ki, hogy megfelelő dózisválasztás esetén az adatok monoton jellegűek lesznek. Az adatok tehát feltételezhetően monoton jellegűek, monotonitásuk formális értékelését lineáris és kvadratikus kontrasztokkal végzik. Amennyiben az adatok valóban monoton jellegűek, (az OECD 2006 ajánlása szerint) az ismétlések mediánértékét elemző Jonckheere–Terpstra-féle trendpróba elvégzése javasolt. Ha a kvadratikus kontraszt szignifikáns, a lineáris kontraszt pedig nem az, az adatok nem monoton jellegűek.

▼M8

Ha az adatok nem monoton jellegűek, különösen ha azért, mert a legnagyobb vagy második legnagyobb dózissal végzett kezelés korlátozott választ vált ki, akkor fontolóra kell venni az adatbázis csökkentését, hogy az elemzést e kezelések nélkül lehessen elvégezni. Döntést szakmai megítélésre kell alapozni, továbbá figyelembe kell venni az összes rendelkezésre álló adatot, főképp azokat az adatokat, amelyek e dózisszintek nyilvánvaló toxicitását jelzik.

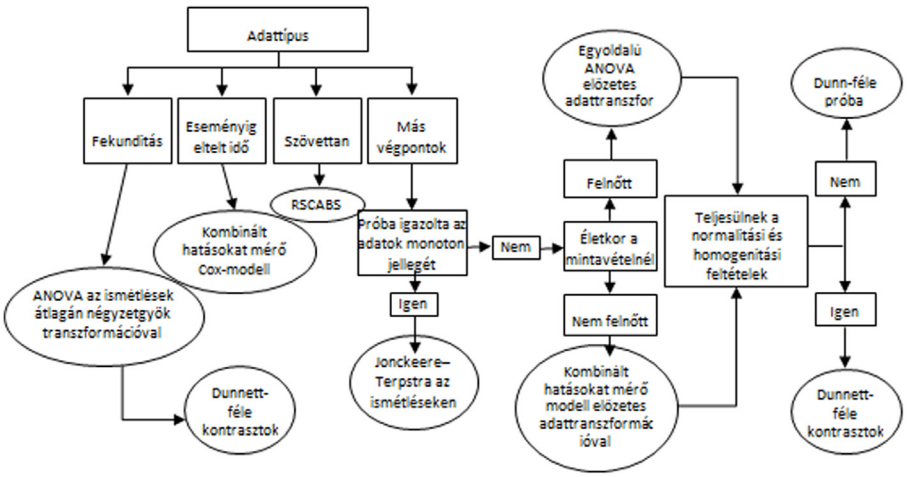
A testtömegre és a testhosszra vonatkozó adatokat nem ajánlatos transzformálni, bár esetenként szükséges lehet. A vitellogeninre vonatkozó adatokon azonban ajánlatos logaritmikus transzformációt, a másodlagos nem jellegre (farok alatti úszó papilláris nyúlványaira) vonatkozó adatokon négyzetgyök transzformációt, a kikelési arányra, a túlélési arányra, az ivararányra és a termékeny ikrák arányára vonatkozó adatokon pedig négyzetgyök arkusz-szinusz transzformációt végezni. A kikelésig eltelt időt és az első ívásig eltelt időt „eseményig eltelt időt” jelző adatként kell kezelni, és felső határt átlépő adatként ki kell zárni az azokra az embriókra vonatkozó adatokat, amelyek nem keltek ki a megadott időszak alatt és azokra az ismétlésekre vonatkozó adatokat, amelyekben nem történt ívás. A kikelésig eltelt időt az egyes ismétlések átlagos kikelési napja alapján kell meghatározni. Ezeket a végpontokat a kombinált hatásokat mérő Cox-féle arányos kockázati modellel kell elemezni.

A felnőtt mintákból származó biológiai adatokat ismétlésenként egy mérésből nyerik, amelynek során az egyes akváriumokban (ismétlésekben) egy XX hal és egy XY hal található. Ezért az ismétlések átlagát egyoldalú varianciaanalízissel (ANOVA) érdemes vizsgálni. Amennyiben az ANOVA feltételezései (az ANOVA maradékain a Shapiro–Wilk-féle próbával mért normál eloszlás és a Levene-féle próbával mért szóródáshomogenitás) beigazolódnak, a kontrollétól eltérő eredményt adó kezeléseket Dunnett-féle kontrasztokkal kell meghatározni. Ha azonban az ANOVA feltételezései nem igazolódnak be, a Dunn-féle próbával kell meghatározni, hogy mely kezelések eredményei tértek el a kontrollétól. Hasonló eljárást érdemes alkalmazni az arányszámban megadott adatoknál (termékenység, kikelés és túlélés).

Az ivarérés előtti álló halak mintáiból származó biológiai adatokat ismétlésenként 1–8 mérés során szerzik, így változó egyedszám képezheti az egyes genotípusos ivarok ismétlésenkénti átlagának alapját. Ezért érdemes kombinált hatásokat mérő ANOVA-modellt használni, majd Dunnett-féle próbával meghatározni a kontrasztokat, amennyiben beigazolódtak a (kombinált hatásokat mérő ANOVA maradékain mért) normál eloszlásra és a szóródáshomogenitásra vonatkozó feltételezések. Ha nem igazolódtak be a feltételezések, a Dunn-féle próbával kell meghatározni, hogy mely kezelések eredményei tértek el a kontrollétól.

2. ábra

A MEOGRT adatelemzéséhez ajánlott statisztikai eljárások folyamatábrája.



▼**M8**

SZAKIRODALOM

(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. KÉTÉLTŰ LÁRVÁK NÖVEKEDÉSI ÉS FEJLŐDÉSI VIZSGÁLATA (LAGDA)

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 241. vizsgálati iránymutatásában (2015) leírt módszerrel. A kétéltű fajok toxikus vegyi anyagokkal szembeni kitettségéből fakadó káros következmények kimutatására és jellemzésére alkalmas vizsgálat kifejlesztése és validálása iránti igény azokból az aggodalmakból ered, hogy egyes vegyi anyagok a környezetben előforduló mennyiségben káros hatással lehetnek az emberekre és az élővilágra egyaránt. A Kétéltű lárvák növekedési és fejlődési vizsgálata (LAGDA) című OECD-iránymutatás által leírt, kétéltű fajokon végezhető toxicitási vizsgálat a megtermékenyítéstől a korai növedékkorig tartó időszak alatti növekedéssel és fejlődéssel foglalkozik. A jellemzően 16 héten át tartó vizsgálat a korai fejlődést, az átalakulást, a túlélést, a növekedést és részlegesen a reproduktív rendszer érését értékeli. Emellett lehetővé teszi egy sor másik végpont mérését is, amelyek segítségével elvégezhető az endokrin rendszert feltételezhetően károsító vegyi anyagok, valamint a fejlődési és reprodukciós toxicitást okozó egyéb típusú anyagok diagnosztikus értékelése. Az ebben a vizsgálati módszerben ismertetett eljárást az Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynöksége (U.S. EPA) által és Japán támogató közreműködésével az afrikai karmosbékán (*Xenopus laevis*) végzett validálási munka alapján dolgozták ki (1). Bár valószínűleg más kétéltű fajokra is kidolgozható olyan növekedési és fejlődési vizsgálati protokoll, amelynek egyik fontos eleme a genetikai ivar megállapításának képessége, az e vizsgálati módszerben részletezett egyedi eljárások és megfigyelt végpontok kizárólag a *Xenopus laevisre* alkalmazhatók.

2. A LAGDA egy magasabb szintű kétéltű vizsgálatként alkalmazható a káros hatásokra vonatkozó átfogóbb koncentráció-válasz adatok gyűjtésére, amelyek alkalmasak arra, hogy ökológiai kockázatfelmérés keretében azonosítsák és jellemezzék a veszélyeket. A vizsgálat az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére vonatkozó fogalmi keretének 4. szintjén helyezkedik el, ahol az in vivo vizsgálatok az endokrin rendszer releváns végpontjaira gyakorolt káros hatásokról is szolgáltatnak adatokat (2). Az általános kísérleti terv alapján az *X. laevis* embriókat a Nieuwkoop és Faber (NF) szerinti 8–10. stádiumban (3) a vizsgálati vegyi anyag legalább négy különböző koncentrációjával kezelik (az egyes koncentrációkat általában legalább fél logaritmikus osztásköz választja el egymástól) és kontrollvizsgálat(ok)at is végeznek egészen a kontroll NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamát követő 10 hétig, egy közbenső részmintát vesznek az NF szerinti 62. stádiumban (a megtermékenyítés utáni 45. napján nem később, többnyire a megtermékenyítés után 45. nap körül). Minden egyes vizsgálati koncentráció esetében négy ismétlést javasolnak, kontrollként szolgáló nyolc ismétléssel kiegészítve. A kezelés során (a közbenső részmintavételnél és a vizsgálat lezárásakor végzett végső mintavételnél) értékelt végpontok közé tartoznak az általános toxicitást jelző végpontok: a mortalitás, a rendellenes viselkedés, a növekedést meghatározó tényezők (testhossz és testtömeg), valamint azok a végpontok, amelyek révén jellemezhetők az ösztrogén, az androgén vagy a pajzsmirigy által közvetített fiziológiai folyamatokat célzó konkrét endokrin toxicitási hatásmechanizmusok. A módszer elsődleges célja a populációnál esetlegesen fellépő releváns hatások (vagyis a túlélésre, a fejlődésre, a növekedésre és a reproduktív fejlődésre gyakorolt káros hatások) meghatározása, amelyek alapján kiszámítható a megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) vagy egy hatásos koncentráció, amely a mért végpontban × % változást okoz (ECx). Ugyanakkor megjegyzendő, hogy az ECx megállapításán alapuló megközelítések ritkán alkalmazhatók az ilyen nagy léptékű vizsgálatokra, ahol a vizsgált koncentrációk számának a kívánt ECx meghatározásához szükséges növelése kivitelezhetetlen lehet. Az is megjegyzendő, hogy ez a módszer magával a reprodukciós fázissal nem foglalkozik. Az e vizsgálati módszerben használt fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

3. Miután e meglehetősen összetett vizsgálat validálását korlátozott számú vegyi anyagon és korlátozott számú laboratórium bevonásával végezték el, és ez idáig a laboratóriumok közötti reprodukálhatóságot sem dokumentálták

▼M8

kísérleti adatokkal, várható, hogy amikor elegendő számú vizsgálat áll rendelkezésre ezen új vizsgálati terv hatásának megállapítására, az OECD 241. vizsgálati iránymutatását a szerzett tapasztalatok fényében felül fogják vizsgálni, és szükség szerint átdolgozzák. A LAGDA egy fontos vizsgálat, amely a vegyi anyagok által az érzékeny lárvastádiumban kiváltott hatások értékelésével felméri a kétéltű populáció hanyatlásához potenciálisan hozzájáruló tényezőket, a lárvastádiumban ugyanis a túlélésre és a fejlődésre, azon belül a szaporítószervek rendes fejlődésére gyakorolt hatások hátrányosan érinthetik a populációkat.

4. A vizsgálat az endokrin és nem endokrin mechanizmusok által előidézett apikus hatás(ok) észlelésére szolgál, és magában foglal olyan diagnosztikus végpontokat, amelyeket részben befolyásolnak az endokrin rendszerre ható mechanizmusok. A LAGDA kidolgozása előtt nem állt rendelkezésre olyan validált vizsgálat, ami ilyen szerepet töltött volna be a kétéltűek vizsgálatában.

5. A vizsgálat megkezdése előtt információkat kell szerezni a vizsgálati vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságairól, különösen annak érdekében, hogy stabil oldatokat lehessen készíteni a vegyi anyagból. Emellett szükség van egy, a vizsgálati vegyi anyag koncentrációinak ellenőrzésére alkalmas, megfelelő érzékenységű elemzési módszerre. A mintegy 16 hétig tartó vizsgálathoz összesen 480 állatot, vagyis *X. laevis* embriót (illetve oldószeres kontroll használata esetén 640 embriót) kell alkalmazni ahhoz, hogy kellő statisztikai erőt képviseljenek a szaporodáshoz kapcsolódó végpontok, úgymint a növekedés, a fejlődés és a reproduktív érés értékeléséhez.

6. A vizsgálati módszernek adott keverék szabályozási célú vizsgálatára történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni, hogy az elfogadható eredményeket biztosít-e a szándékolt szabályozási célra. Megjegyzendő továbbá, hogy ez a vizsgálat nem értékeli közvetlenül a fekunditást, ezért az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére vonatkozó fogalmi keretének 4. szintjénél magasabb szinten történő használatra feltehetően nem alkalmas.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER TUDOMÁNYOS ALAPJA

7. A kétéltűek biológiájával kapcsolatos jelenlegi ismereteink jó része az *X. laevis* laboratóriumi modellfaj használatából származnak. Ez a faj rutinszerűen tenyészthető laboratóriumban, ovulációja kiváltható humán koriogonadotropinnal (hCG-vel), a törzstenyészet állatai pedig tenyésztőktől kereskedelmi forgalomban könnyen beszerezhetők.

8. Mint minden gerinces élőlény esetében, a kétéltűek szaporodását is a hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) tengely szabályozza (4). Az ösztrogének és az androgének közvetítő szerepet töltenek be ebben az endokrin rendszerben, irányítva az ivari kétalakúságot mutató szövetek fejlődését és fiziológiáját. Ez a tengely különösen a kétéltűek életciklusának három elkülönülő fázisában aktív: (1) a lárva szakaszban az ivarmirigyek differenciálódása során, (2) a növendék szakaszban a másodlagos ivari jellegek kifejlődése és az ivarmirigyek érése során, valamint (3) a kifejlett példányok funkcionális szaporodása során. E három fejlődési szakasz mindegyike vélhetően érzékenyen reagál bizonyos vegyi anyagok, például az ösztrogén és az androgén endokrin rendszert zavaró hatására, ami végső soron az élőlények szaporodási képességének csökkenéséhez vezet.

9. Az ivarmirigyek a bipotenciális ivarredő első megjelenésekor, az NF szerinti 43. stádiumban kezdenek fejlődni. Az ivarmirigyek differenciálódása az NF szerinti 52. stádiumban veszi kezdetét, amikor az elsődleges csírasejtek vagy a medulláris szövethez migrálnak (hímeknél) vagy a fejlődő ivarmirigyek

▼M8

kérges régiójában maradnak (nőstényeknél) (3). Először az 1950-es években számoltak be arról, hogy a *Xenopus* ivarmirigyeinek nemi differenciálódási folyamata érzékeny a vegyi anyagok módosító hatására (5) (6). Az ivarmirigy e differenciálódási szakaszában ösztradiollal kezelt ebihalak esetében a hímek ivara megfordul, és felnőttkorukra teljes funkciójú nőstényekké válnak (7) (8). A nőstények ivara is átalakulhat hím ivarrá, erről a hereszövet ebihalakba való átültetését követően számoltak be (9). Bár az aromatázgátlókkal szembeni kitettség is az ivari funkciók megfordulását eredményezi az *X tropicalisban* (10), ezt a jelenséget nem mutatták ki az *X. laervisban*. A múltban a toxikus anyagok ivarmirigyek differenciálódására gyakorolt hatását az átalakulás fázisában lévő ivarmirigyek szövettani vizsgálata alapján határozták meg, az ivarok megfordulását pedig kizárólag az ivararányok elemzése révén tudták megállapítani. Egészen a közelmúltig nem létezett módszer a *Xenopus* genetikai ivarának közvetlen meghatározására. Az *X. laevis* ivari markereinek közelmúltbeli létrehozása lehetővé teszi a genetikai ivar meghatározását és a megfordult ivarú állatok közvetlen azonosítását (11).

10. A hímeknél a növendékek fejlődésének előrehaladtával a vér tesztoszteronszintje a másodlagos ivari jellegek kialakulásával és a herék fejlődésével párhuzamosan növekszik. A nőstényeknél a petefészkek által termelt ösztradiol hatására vitellogenin (VTG) jelenik meg a plazmában, vitellogenikus petesejtek a petefészekben és petevezetékek fejlődnek ki (12). A petevezetékek női másodlagos ivari jellegek, amelyek a szaporodás során a petesejtek érésében játszanak szerepet. A petevezetéken áthaladó petesejtek külsejére nyálkás bevonat kerül, majd megtermékenyítésre készen összegyűlnek a petetömlőben. Úgy tűnik, hogy a petevezeték fejlődését az ösztrogén szabályozza, mivel fejlődése korrelál az *X. laevis* (13) és az *X. tropicalis* (12) vérében mért ösztradiolszintekkel. Beszámolók szerint poliklórozott bifenil vegyületekkel (14) és 4-terc-oktilfenollal (15) való kezelést követően a hímeknél petevezeték fejlődött ki.

A VIZSGÁLAT ELVE

11. A vizsgálati terv alapján az *X. laevis* embriókat az NF szerinti 8–10. stádiumban víz közvetítésével a vizsgálati vegyi anyag négy különböző koncentrációjával kezelik és kontrollvizsgálat(ok)at is végeznek egészen a kontroll NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamát követő 10 hétig, egy közbenső részmintát vesznek az NF szerinti 62. stádiumban. Bár a táplálékon keresztül elvileg a nagymértékben víztaszító vegyi anyagok adagolása is megoldható, ez idáig csekély tapasztalatot szereztek ennek az expozíciós útnak e vizsgálat keretében való alkalmazásáról. Minden vizsgálati koncentrációt négy ismétlésben és minden kontrollt nyolc ismétlésben vizsgálnak. A kezelés során értékelt végpontok közé tartoznak az általános toxicitást jelző végpontok (vagyis a mortalitás, a rendellenes viselkedés és a növekedést meghatározó tényezők (testhossz és testtömeg)), valamint azok a végpontok, amelyek révén jellemezhetők az ösztrogén, az androgén vagy a pajzsmirigy által közvetített fiziológiai folyamatokat célzó konkrét endokrin toxicitási hatásmechanizmusok (vagyis a pajzsmirigy kórszövettana, az ivarmirigy és az ivarmirigy-vezeték kórszövettana, a rendellenes viselkedés, a vérplazma vitellogenin szintje (választható) és a genotípusos/fenotípusos ivararányok).

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGI KRITÉRIUMAI

12. A vizsgálat érvényességéhez az alábbi kritériumoknak kell teljesülniük:

— a vizsgálat során az oldott oxigén koncentrációjának mindvégig el kell érnie a levegőtelítettségi érték 40 %-át;

▼**M8**

— a vízhőmérsékletet a 21 ±1 °C-os tartományban kell tartani, az ismétlések és a kezelések közötti különbség nem haladhatja meg az 1,0 °C-ot;

— a vizsgálati oldat pH-értékét 6,5 és 8,5 között kell tartani, az ismétlések és a kezelések közötti különbség nem haladhatja meg a 0,5-öt;

— bizonyítékkal kell alátámasztani, hogy a vizsgálati vegyi anyag oldatban lévő koncentrációit az átlagos mért értékek ±20 %-os tartományán belül sikerült tartani;

— az expozíciós időszak alatt a mortalitás egyik kontrollismétlésben sem haladhatja meg a 20 %-ot;

— a vizsgálat elindításához kiválasztott íváson belül az életképességnek legalább 70 %-osnak kell lennie;

— a kontrollokban az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartam legfeljebb 45 nap lehet;

— a kontrollokban és az oldószeres kontrollokban (ha végeztek ilyet) a vizsgált élőlények átlagos testtömegének az NF szerinti 62. stádiumban el kell érnie az 1,0 ±0,2 g-ot, a vizsgálat végén pedig a 11,5 ±3 g-ot.

13. Bár ez nem érvényességi kritérium, ajánlatos legalább három – három érvényes ismétlést bevonó – kezelési szintnek rendelkezésre állnia az elemzéshez. Kezelést érvénytelenítő túlzott mortalitásról akkor lehet szó, ha legalább két ismétlésben tapasztalnak 4-nél több (vagyis 20 %-ot meghaladó) elhullást, amely technikai hibával nem magyarázható. Az elemzéshez legalább három – nyilvánvaló toxicitást nem mutató – kezelési szintnek kell rendelkezésre állnia. Nyilvánvaló toxicitásra utaló jel lehet – a teljesség igénye nélkül –, ha az élőlény a víz felszínén lebeg, a tartály alján fekszik, fordítva vagy szabálytalanul úszik, nem emelkedik fel a felszínre, nem reagál az ingerekre, illetve morfológiai rendellenességeket (pl. végtagdeformitások), haemorrhagiás léziókat vagy hasi ödémát mutat.

14. Az érvényességi kritériumoktól való eltérés esetén a vizsgálati adatok megbízhatóságára gyakorolt következményeket mérlegelni kell, az eltéréseket és a mérlegelt következményeket bele kell foglalni a jegyzőkönyvbe.

A VIZSGÁLATI MÓDSZEREK LEÍRÁSA

Berendezés

15. Normál laboratóriumi felszerelés és különösen az alábbiak:

a) hőmérséklet-szabályozó készülék (pl. 21 ±1 °C-ra beállítható fűtőtestek vagy hűtőberendezések);

▼M8

b) hőmérő;

c) binokuláris preparálómikroszkóp és bonceszközök;

d) legalább 4 megapixel felbontású és mikrofunkcióval rendelkező digitális fényképezőgép (ha szükséges);

e) 0,001 mg-ig vagy 1 μg-ig mérni képes analitikai mérleg;

f) oldottoxigénkoncentráció-mérő és pH-mérő;

g) lux egységek mérésére képes fényerősségmérő.

Víz

Eredet és minőség

16. Bármely olyan helyben elérhető hígítóvíz (pl. forrásvíz vagy aktív szénen szűrt csapvíz) használható, amelyben az *X. laevis* lárvák normálisan növekednek és fejlődnek, és rendelkezésre állnak az adott vízben való normális növekedést alátámasztó bizonyítékok. Mivel a helyi vízminőség területenként lényegesen eltérhet, a víz minőségét elemezni kell, különösen ha nem állnak rendelkezésre korábbi adatok a víz kétéltű lárvák tenyésztésére való alkalmasságáról. Nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), főbb anionok és kationok (pl. Ca^{2+}, mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), növényvédő szerek, összes szerves szén és szuszpendált szilárd anyag mérését el kell végezni a vizsgálat megkezdése előtt és/vagy például félévente, amennyiben a hígítóvíz ismerten viszonylag állandó minőségű. Az elfogadható minőségű hígítóvíz néhány kémiai tulajdonságának felsorolása a 2. függelékben található.

A vizsgálati víz jodidkoncentrációja

17. Annak érdekében, hogy a pajzsmirigy pajzsmirigyhormonok szintetizálásával biztosítani tudja a normál átalakulást, elegendő jodidnak kell elérhetőnek lennie a lárvák számára a vízben és a táplálékforrásokban. A megfelelő fejlődést biztosító minimális jodidkoncentráció tekintetében jelenleg sem a táplálékra, sem a vízre vonatkozólag nem állnak rendelkezésre empirikus iránymutatások. A jodid elérhetősége hatással lehet a pajzsmirigynek a pajzsmirigyre ható anyagokkal szembeni válaszkészségére, és ismert az is, hogy a jodid módosítja a pajzsmirigy alapaktivitását, amit figyelembe kell venni a pajzsmirigy kórszövettani eredményeinek értelmezésénél. A korábbi munkák alapján a vizsgálat bizonyítottan jól működik, ha a hígítóvíz jodid- (I^-) koncentrációja 0,5 és 10 μg/l között van. Ideális esetben a vizsgálat teljes időtartama alatt a hígítóvíz (nátrium vagy kálium só formájában hozzáadott) jodidkoncentrációja legalább 0,5 μg/l. Ha a vizsgálati víz ioncserélt vízből mesterségesen készített víz, legalább 0,5 μg/l koncentrációban jódot kell hozzáadni. A vizsgálati jegyzőkönyvbe bele kell foglalni a vizsgálati víz (a hígítóvíz) mért jodidkoncentrációját, valamint azt, ha adott esetben a vizsgálati vizet jóddal vagy más sóval egészítették ki. Nem csak a vizsgálati víz, hanem a táplálék jódtartalma is mérhető.

Expozíciós rendszer

18. A vizsgálatot átfolyásos hígítórendszer használatával dolgozták ki. A rendszer vízzel érintkező elemeinek üvegből, rozsdamentes acélból és/vagy más kémiailag semleges anyagból kell készülnie. Expozíciós tartályként üvegből vagy rozsdamentes acélból készült akváriumot kell használni, 4,0 és 10,0 liter közötti hasznos tartálytérfogattal (10–15 cm minimális vízmélységgel). A rendszernek képesnek kell lennie valamennyi expozíciós koncentráció, a kontroll és szükség esetén az oldószeres kontroll számára megfelelő feltételeket biztosítani, kezelésenként négy, kontrollonként nyolc ismétlésben. Az egyes tartályok áramlási sebességének állandónak kell lennie a biológiai feltételek, valamint a vegyi anyaggal történő expozíció fenntartása érdekében. Az áramlási sebességet ajánlatos úgy meghatározni (pl. naponta

▼M8

legalább 5 vízforgatás), hogy a vegyi anyag koncentrációja ne csökkenhessen a vizsgált élőlények és az akváriumban jelen lévő vízi mikroorganizmusok metabolikus aktivitása, abiotikus lebomlási utak (hidrolízis, fotolízis) vagy távozás (elillanás, szorpció) miatt. Az expozíciós rendszeren belül a kezelési tartályokat véletlenszerűen kell egy-egy térbeli pozícióhoz rendelni, hogy csökkenteni lehessen a pozícióból fakadó lehetséges hatásokat, köztük a hőmérséklet, a fényerő stb. enyhe eltéréseit. Az átfolyásos expozíciós rendszerek felállítására vonatkozó további információkért olvassa el az ASTM „Vizsgálati anyagok akut toxicitási vizsgálata halakon, makroszkopikus gerincteleneken és kétéltűeken” című standard útmutatóját (16).

A vegyi anyag bejuttatása: a vizsgálati oldatok elkészítése

19. A vizsgálati oldatok expozíciós rendszerbe juttatásához a vizsgálati vegyi anyag törzsoldatát megfelelő szivattyúval vagy más készülékkel adagolják az expozíciós rendszerbe. Az expozíciót megelőzően a törzsoldat áramlási sebességét a vizsgálati oldatok analitikus módszerrel való megerősítésével összhangban kalibrálják, az áramlási mennyiséget pedig a vizsgálat során rendszeresen ellenőrzik. Az egyes kamrákba juttatott vizsgálati oldatot legalább napi 5 térfogatcsere révén megújítják.

20. A vizsgálati vegyi anyag rendszerbe történő bejuttatására alkalmazott módszer a vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól függően változhat. Ezért a vizsgálat megkezdése előtt be kell gyűjteni a vegyi anyagra vonatkozó, a vizsgálhatóság meghatározása szempontjából releváns alapinformációkat. Az vizsgálati vegyi anyag tulajdonságaival kapcsolatos hasznos információk többek között a szerkezeti képlet, a molekulatömeg, a tisztaság, a vízben és a fény hatására tanúsított stabilitás, a pK_a és a K_{ow}, a vízoldékonyság (lehetőleg a vizsgálati közegben), a gőznyomás, továbbá az azonnali biológiai lebonthatóságra irányuló vizsgálat eredményei (C.4. vizsgálati módszer (17) vagy C.29. vizsgálati módszer (18)). A vízoldékonyságból és a gőznyomásból meghatározható a Henry-állandó, amely megmutatja, hogy előfordulhat-e a vizsgálati vegyi anyag párolgás miatt eltávozása. Alaposan mérlegelni kell, hogy a fenti információk hiányában elvégezhető-e a vizsgálat, mivel a vizsgálat kialakítása függ a vizsgálati vegyi anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól, így ezen adatok nélkül a vizsgálat eredménye nehezen értelmezhető vagy semmitmondó lehet. Olyan megbízható analitikai módszerrel kell rendelkezni a vizsgálati oldatokban lévő vizsgálati vegyi anyag számszerűsítésére, amelynek pontossága és érzékelési határa ismert és dokumentált. A vízben oldódó vizsgálati vegyi anyagokat fel lehet oldani a hígítóvíz alikvot részeiben olyan koncentrációban, amely lehetővé teszi a vegyi anyag kívánt vizsgálati koncentrációban történő bejuttatását az átfolyásos rendszerbe. A szobahőmérsékleten folyékony vagy szilárd és vízben közepesen oldódó vegyi anyagokat folyadék:folyadék vagy folyadék:szilárd telítési módszerek (pl. üveggyapot oszlopszaturátorok) használatával lehet bejuttatni (19). Bár a táplálékon keresztül elvileg a nagymértékben víztaszító vegyi anyagok adagolása is megoldható, csekély tapasztalat áll rendelkezésre ennek az expozíciós útnak e vizsgálat keretében való alkalmazásáról.

21. A kiválasztott koncentrációjú vizsgálati oldatok a törzsoldat hígításával készíthetők el. A törzsoldatot lehetőleg a vizsgálati vegyi anyagnak a hígítóvízbe, mechanikai eszközök (pl. keverő és/vagy ultrahang) segítségével történő bekeverésével vagy megmozgatásával kell elkészíteni. Telítési oszlopok/rendszerek vagy passzív adagolási módszerek (20) is alkalmazhatók a megfelelő koncentrációjú törzsoldat elkészítéséhez. Előnyben kell részesíteni a hordozómentes vizsgálati rendszereket; a különböző vizsgálati vegyi anyagok azonban változatos fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, ami valószínűleg eltérő megközelítést igényel a vegyi anyagoknak való expozíciót szolgáló víz elkészítése során. Minden erőfeszítést meg kell tenni az oldószerek vagy hordozók elkerülése érdekében, mivel:

▼M8

(1) bizonyos oldószerek maguk is toxicitást és/vagy nem kívánatos vagy nem várt válaszokat idézhetnek elő, (2) a vegyi anyagoknak a vízoldhatóságuk határán túli vizsgálata (ami gyakran előfordul oldószerek használata esetén) a hatásos koncentráció pontatlan meghatározását eredményezheti, és (3) hosszabb távú vizsgálatok során az oldószerek használata jelentős mértékű „biofilmképződést" eredményezhet, amely mikrobiális tevékenységgel jár együtt, ami befolyásolhatja a környezeti feltételeket és a vizsgált koncentrációk fenntartásának képességét, valamint (4) oldószer használata esetén olyan dokumentált adatok hiányában, amelyek igazolják, hogy az oldószer nem befolyásolja a vizsgálat kimenetelét, oldószeres kontrollként szolgáló kezelést kell végezni, aminek jelentős állatjóléti következményei vannak, mivel a vizsgálat lefolytatása további állatok bevonását igényli. A nehezen vizsgálható vegyi anyagoknál legvégső esetben oldószert lehet alkalmazni, és a legjobb módszer meghatározása érdekében tanulmányozni kell „A nehezen vizsgálható anyagok és keverékek vízi toxikológiai vizsgálata" című OECD-iránymutatást (21). A megfelelő oldószert a vizsgálati vegyi anyag kémiai tulajdonságai és az oldószer használatára vonatkozó dokumentált kontrolladatok rendelkezésre állása határozzák meg. Dokumentált adatok hiányában az oldószer megfelelőségét a végleges vizsgálat lefolytatása előtt meg kell határozni. Amennyiben elkerülhetetlen az oldószer használata, és mikrobiális tevékenység (biofilmképződés) figyelhető meg, ajánlatos a vizsgálat során (legalább hetente) feljegyezni/jelentésbe foglalni a tartályonkénti biofilmképződést. Ideális esetben az oldószer koncentrációját állandó értéken tartják az oldószeres kontroll és a vizsgálati vegyi anyaggal történő minden kezelés során. Amennyiben az oldószer koncentrációját nem tartják állandó értéken, az oldószeres kontrollban a vizsgálati kezelés során alkalmazott legmagasabb oldószer-koncentrációt kell vizsgálni. Oldószerhordozó használata esetén az oldószer legmagasabb koncentrációja nem haladhatja meg a 100 µl/l vagy 100 mg/l értéket (21), és az oldószer koncentrációját a lehető legalacsonyabb szinten (pl. ≤20 µl/l) javasolt tartani annak érdekében, hogy elkerülhetők legyenek az oldószer esetleges hatásai a mért végpontokra (22).

Kísérlethez felhasznált állatok

A vizsgálathoz használt fajok

22. A vizsgálatban alkalmazott faj az *X. laevis*, mert: (1) világszerte rutinszerűen tenyésztik a laboratóriumokban, (2) könnyen beszerezhető kereskedelmi forgalomban is és (3) genetikai ivara meghatározható.

A felnőtt állatok gondozása és tenyésztése

23. Az *X. laevis* megfelelő gondozásáról és tenyésztéséről egy szabványosított iránymutatás nyújt tájékoztatást (23). Az *X. laevis* tartását és gondozását Read is ismerteti (24). A párosodás kiváltása érdekében három–öt felnőtt nőstény és hím pár hasüregébe humán koriogonadotropint (hCG-t) fecskendeznek be. A nőstény példányokba körülbelül 800–1 000 NE, a hím példányokba körülbelül 500–800 NE 0,6–0,9 %-os sóoldatban (vagy béka Ringer-oldatban, egy kétéltűekkel való használatra kifejlesztett izotóniás sóoldatban) feloldott hCG-t injektálnak. A befecskendezett térfogatnak megközelítőleg 10 µl/g testtömegarányúnak kell lennie (~1 000 µl). Ezt követően az indukált tenyészpárokat az amplexus elősegítése érdekében nagy tartályokban, zavartalan, statikus körülmények között tartják. A tenyésztőtartályok alján (pl. 1,25 cm-es nyílásokkal rendelkező) rozsdamentes acél hálóból készült álfenéknek kell lennie, amely lehetővé teszi, hogy a peték a tartály aljára essenek. A késő délután hCG-vel beinjekciózott békák a petéik többségét általában a következő nap délelőttjére rakják le. Miután elegendő mennyiségű petét raktak le és termékenyítettek meg, a felnőtt példányokat el kell távolítani a tenyésztőtartályokból. Ezután begyűjtik a petéket, a kocsonyás bevonatot pedig L-ciszteinnel végzett kezeléssel eltávolítják (23). Elkészítenek egy 2 %-os L-cisztein oldatot, a pH-t 1 M NaOH hozzáadásával 8,1 értékre állítják be. Ezt a 21 °C-os oldatot beleöntik egy 500 ml-es, egy ívásból származó petéket tartalmazó

▼M8

Erlenmeyer-lombikba, egy-két percen keresztül óvatosan kavargatják, majd 21 °C-os tenyésztővízben 6–8 alkalommal alaposan átöblítik. Ezt követően a petéket áthelyezik egy kristályosító csészébe, majd megállapítják, hogy az életképesség meghaladja-e a 70 %-ot, és a sejtosztódás fázisában lévő embriók minimális rendellenességet mutatnak-e.

VIZSGÁLATI TERV

Vizsgálati koncentrációk

24. A vegyi anyagot ajánlatos legalább négy koncentrációban vizsgálni a megfelelő kontrollokkal együtt (szükség esetén oldószeres kontrollokkal). A koncentrációk közötti távolság meghatározásához általában ajánlatos legfeljebb 3,2-es osztótényezőt használni.

25. A kétéltűekre vonatkozó korábbi vizsgálatok eredményeit a lehetőségekhez mérten fel kell használni a vizsgálatban alkalmazandó legmagasabb vizsgált koncentráció meghatározásához, hogy elkerülhető legyen a nyilvánvalóan toxikus koncentrációk használata. E legmagasabb koncentráció megállapításához hozzájárulhatnak például a meglévő kétéltűvizsgálatokból, úgymint a C.38. vizsgálati módszerből, vagyis a kétéltű-átalakulási vizsgálatból (25), a *Xenopus* fajt alkalmazó békaembrió teratogenezis vizsgálatból (23) és/vagy a halakon végzett vizsgálatokból – például a C.48., C.41. és C.49. vizsgálati módszerből (26) (27) (28) – származó mennyiségi szerkezetaktivitási összefüggések, kereszthivatkozások és adatok. A LAGDA lefolytatása előtt végezhető dózisbehatároló kísérlet. A dóziskereső kísérletben a kezelést ajánlatos a megtermékenyítést követő 24 órán belül elkezdeni és 7–14 napon keresztül (vagy szükség esetén még tovább) folytatni, a vizsgálati koncentrációkat pedig úgy kell megállapítani, hogy a köztük lévő távolságot legfeljebb 10-es tényezővel határozzák meg. A dózisbehatároló kísérlet eredményei alapján kell meghatározni a LAGDA során alkalmazott legmagasabb vizsgálati koncentrációt. Amennyiben a vizsgálat során oldószert kell használni, az oldószer megfelelőségét (vagyis hogy hatással van-e a vizsgálat kimenetelére) meg lehet határozni a dózisbehatároló vizsgálat részeként.

Vizsgálati csoportok és kontrollok ismétlései

26. Vizsgálati koncentrációnként legalább négy tartályt (ismétlést), a kontrollhoz (és szükség esetén az oldószeres kontrollhoz) pedig legalább nyolc ismétlést kell használni (vagyis a megfelelő statisztikai erő biztosítása érdekében a kontrollnak és az esetleges oldószeres kontrollnak kétszer annyi ismétlést kell tartalmaznia, mint az egyes kezelt csoportoknak). Az egyes ismétlések legfeljebb 20 állatot tartalmazhatnak. A vizsgálat állatok minimális száma 15 (az NF szerinti 62. stádiumban végzett részmintavétel során 5 a növendékek esetében 10). Mivel számolni kell az esetleges mortalitással, minden ismétléshez további állatokat adnak hozzá, miközben fenntartják a kritikus egyedszámot, azaz 15 egyedet.

ELJÁRÁS

A vizsgálat áttekintése

27. A vizsgálatot újszülött (az NF szerinti 8–10. stádiumban lévő) embriókkal kezdik meg és a növendékkori fejlődésig folytatják. Az állatokat naponta ellenőrzik, hogy felmérjék a mortalitást és a rendellenes viselkedés jeleit. Az NF szerinti 62. stádiumban a lárvák egy részmintáját (ismétlésenként legfeljebb 5 állat) begyűjtik, és megvizsgálják a különböző végpontokat (1. táblázat). Miután az összes állat elérte az NF szerinti 66. stádiumot, vagyis lezárult az átalakulási fázis (illetve a vizsgálat kezdetétől számított 70. nap

▼M8

után, amelyik előbb bekövetkezik), véletlenszerű selejtezéssel (részmintavétel nélkül) az állatok számát tartályonként 10-re csökkentik (lásd a 43. pontot), a fennmaradó állatokat pedig tovább kezelik a kontroll NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamát követő 10 hétig. A vizsgálat végén a növendékek mintáján további méréseket végeznek (1. táblázat).

Expozíciós körülmények

28. A vizsgálati paraméterek teljes összefoglalása a 3. függelékben található. Az expozíciós időszak alatt naponta mérni kell a vizsgálati oldatok oldottoxigén-koncentrációját, hőmérsékletét és pH-értékét. Az oldatok vezetőképességét, lúgosságát és keménységét havonta mérik. A vizsgálati oldatok vízhőmérsékletét illetően az ismétlések és a kezelések közötti (egy napon belüli) különbség nem haladhatja meg az 1,0 °C-ot. A vizsgálati oldatok pH-értéke tekintetében az ismétlések és a kezelések közötti különbség nem haladhatja meg a 0,5-öt.

29. Az el nem fogyasztott táplálék és az ürülék eltávolítása érdekében az expozíciós tartályokat naponta lehet szifonnal tisztítani, ügyelve a tartályok közötti keresztszennyeződés elkerülésére. Gondoskodni kell róla, hogy az állatokat a lehető legkisebb stressz és trauma érje, különösen az akváriumok mozgatása és takarítása, valamint az állatok kezelése közben. Kerülni kell a stresszhatást kiváltó körülményeket/tevékenységeket, mint például a hangos és/vagy szakadatlan zajt, az akváriumok kopogtatását és a tartályokban okozott rezgést.

A vizsgálati vegyi anyagnak való kezelés időtartama

30. A kezelést újszülött (az NF szerinti 8–10. stádiumban lévő) embriókkal kezdik meg és a kontrollcsoportban az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamot (a vizsgálat kezdetétől számítva legfeljebb 45 nap) követő 10 hétig folytatják. A LAGDA időtartama általában 16 hét (legfeljebb 17 hét).

A vizsgálat elindítása

31. A vizsgálat elindításához olyan szülőket kell használni, amelyekről korábban kimutatták, hogy az utódaik genetikai ivara meghatározható (5. függelék). A felnőttek ívását követően begyűjtik az embriókat, kocsonyás bevonatuk eltávolítása érdekében ciszteinnel kezelik őket, majd egy szűrővizsgálat keretében meghatározzák életképességüket (23). A ciszteines kezelésre azért van szükség, hogy a szűrővizsgálat során az embriók ne ragadjanak hozzá a különböző felületekhez. A szűrővizsgálatot preparálómikroszkóp alatt végzik, megfelelő méretű szemcseppentővel eltávolítva a nem életképes embriókat. Lehetőség szerint egyetlen, 70 %-nál nagyobb életképességet mutató ívásból származó egyedeket használjanak a vizsgálathoz. Az NF szerinti 8–10. stádiumban lévő embriókat véletlenszerűen szétosztják a megfelelő mennyiségű hígítóvízzel feltöltött expozíciós kezelési tartályok között, úgy, hogy minden egyes tartály 20 embriót tartalmazzon. Az embriókat az áthelyezés során óvatosan kell kezelni a kezeléssel járó stressz minimalizálása és a sérülések elkerülése érdekében. A megtermékenyítés utáni 96. órára az ebihalaknak már keresztül kellett jutniuk a vízoszlopon és el kellett kezdeniük feltapadni a tartály oldalára.

Etetési rend

32. A LAGDA protokoll fontos része a táplálék és a táplálékmennyiség változtatása az *X. laevis* különböző életszakaszai során. A lárva fázis során a táplálék túladagolása jellemzően megnöveli a gerincferdülés (scoliosis) gyakoriságát és súlyosságát (8. függelék), amit kerülni kell. Ezzel szemben a lárva fázis során az elégtelen mennyiségű táplálék rendkívül eltérő fejlődési ütemet eredményez a kontrollok között, ami csökkentheti a statisztikai erőt

▼M8

vagy zavarhatja a vizsgálati eredményeket. A 4. függelék tájékoztatást nyújt az átfolyásos körülmények között nevelt *X. laevis* lárvák és növendékek ajánlott táplálékáról és etetési rendjéről, alternatív megoldások is alkalmazhatók, amennyiben biztosítják a vizsgálati élőlények kielégítő növekedését és fejlődését. Fontos megjegyezni, hogy az endokrin rendszerrel kapcsolatos végpontok mérése esetén a tápláléknak nem szabad az endokrin rendszerre ható anyagokat, például szójalisztet tartalmaznia.

A lárvák etetése

33. A lárvák ajánlott tápláléka tenyésztővízzel (vagy hígítóvízzel) összekevert ivadékindító pisztrángtápból, *Spirulina* algakorongokból és pehely formájú aranyhaltápból (pl. TetraFin® pelyhek, Tetra, Németország) tevődik össze. Ezt a keveréket hétköznap napi három alkalommal, hétvégén naponta egyszer adagolják az állatoknak. Az ebihalakat a megtermékenyítés utáni 8. naptól kezdve etetik élő *Artemia* sórákkal, vagyis 24 órás naupliusszal is, munkanapokon naponta kétszer, hétvégén naponta egyszer. A lárvák etetésének, amelyet minden vizsgálati edényben azonos módon kell elvégezni, lehetővé kell tennie a vizsgált állatok megfelelő növekedését és fejlődését, biztosítva ezáltal a vizsgálat eredményeinek reprodukálhatóságát és átvihetőségét: (1) a kontrolloknál az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartam legfeljebb 45 nap lehet, és (2) a kontrolloknál az NF szerinti 62. stádiumban az átlagos testtömegnek ajánlatos az 1,0 ±0,2 g tartományban lennie.

A növendékek etetése

34. Az átalakulási fázis lezárultát követően a táplálék prémium minőségű süllyedő békatápból áll, például Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, USA) (4. függelék). A békaporontyok (fiatal növendékek) számára a pelletek méretét csökkenteni kell, ehhez rövid ideig kávédarálóban vagy turmixgépben őrlik, illetve mozsárban mozsártörővel apróra zúzzák a pelleteket. Amint a növendékek megfelelő méretűre nőnek ahhoz, hogy el tudják fogyasztani az egész pelleteket, nincs többé szükség azok őrlésére vagy apróra zúzására. Az állatokat naponta egyszer kell táplálni. A növendékek etetésének biztosítani kell az élőlények megfelelő növekedését és fejlődését: a vizsgálat végén a kontrollnövendékek átlagos testtömegének ajánlatos a 11,5 ±3 g tartományban lennie.

Analitikai kémia

35. A vizsgálat megkezdése előtt például a meglévő információk és ismeretek alapján meg kell határozni a vizsgálati vegyi anyag stabilitását (pl. oldhatóságát, lebonthatóságát és illékonyságát), valamint az összes elemzési módszert. Amennyiben az adagolás hígítóvízben történik, a rendszer működésének ellenőrzése céljából javasolt az egyes vizsgálati tartályokba (ismétlésekbe) helyezett vizsgálati oldatokat a vizsgálat kezdete előtt analizálni. Az expozíciós időszak során a vizsgálati vegyi anyag koncentrációit megfelelő időközönként – lehetőleg minden heten – meghatározzák az egyes kezelt csoportok egyik tartályában, az adott kezelt csoporton belül minden héten másik tartályt vizsgálva. Az eredményeket célszerű a ténylegesen mért koncentrációértékekre alapozni. Amennyiben azonban az oldatban lévő vizsgálati vegyi anyag koncentrációját sikerült a vizsgálatok során mindvégig a névleges koncentráció ±20 %-os tartományán belül tartani, akkor az eredményeket a névleges vagy a mért értékekre is lehet alapozni. Emellett a vizsgálat teljes időtartama alatt az egy kezelésen belül mért vizsgálati koncentrációk variációs koefficiense (CV) minden koncentrációban legfeljebb 20 % lehet. Amennyiben a mért koncentrációértékek nem maradnak a névleges koncentrációértékek 80–120 %-án belül (például biológiailag nagyon könnyen lebontható vagy nagymértékben abszorbeáló vegyi anyagok esetében), a hatásos koncentrációkat átfolyásos vizsgálatok esetében a számtani átlaghoz viszonyítva kell meghatározni és kifejezni.

▼M8

36. A hígítóvíz és a törzsoldat áramlási sebességét az expozíciós időszak alatt mindvégig megfelelő időközönként (pl. hetente háromszor) ellenőrizni kell. Olyan vegyi anyagok esetében, amelyeket néhány vagy egyetlen névleges koncentrációban sem lehet kimutatni (például mert gyorsan lebomlanak vagy abszorbeálnak a vizsgálati edényekben, vagy mert jelentős részben felhalmozódnak a kezelt állatok szervezetében), javasolt a kísérleti oldat megújítási arányát minden kamrában úgy meghatározni, hogy a vizsgálati koncentrációk a lehető legállandóbbak legyenek.

Megfigyelések és végpontmérések

37. A kezelés során értékelt végpontok közé tartoznak a toxicitást jelző végpontok, azon belül a mortalitás, a rendellenes viselkedés, úgy mint a betegség és/vagy az általános toxicitás klinikai tünetei és a növekedést meghatározó tényezők (testhossz és testtömeg), valamint azok a patológiás végpontok, amelyek egyaránt reagálhatnak az általános toxicitásra és az ösztrogén, az androgén vagy a pajzsmirigy által közvetített útvonalakat célzó endokrin hatásmechanizmusokra. Emellett a vizsgálat végén igény szerint mérhető a vérplazma VTG-koncentrációja. A VTG mérése hozzájárulhat a vizsgálati eredményeknek az endokrin rendszert feltehetően zavaró anyagok endokrin mechanizmusaival összefüggésben történő értelmezéséhez. A végpontokat és mérésük ütemtervét az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat

A LAGDA végpontjainak áttekintése

Végpontok (*)	Naponta	Közbenső mintavétel (lárvák mintái)	Vizsgálat vége (növendékek mintái)
Mortalitás és rendellenességek	X		
Az NF szerinti 62. stádiumig eltelt idő		X	
(Kór)szövettan (pajzsmirigy)		X	
Morfometria (testtömeg és testhossz növekedése)		X	X
Hepato-szomatikus index (LSI)			X
Genetikai/fenotípusos ivararány			X
Kórszövettan (ivarmirigyek, reproduktív vezetékek, vese és máj)			X
Vitellogenin (VTG) (választható)			X

(*) Az összes végpontot statisztikailag elemzik.

Mortalitás és napi megfigyelések

38. Naponta ellenőrizni kell, hogy a vizsgálati tartályokban vannak-e elpusztult állatok, és a mortalitást minden tartály esetében fel kell jegyezni. Az elhullott állatokat észrevételüket követően azonnal el kell távolítani a vizsgálati tartályból. Az elhullott állatok fejlődési stádiumát a következők szerint kell kategorizálni: NF szerinti 58. stádium előtt (mellső végtagok megjelenése előtti időszak), NF szerinti 58.–NF szerinti 62. stádium, NF szerinti 63.–NF szerinti 66. stádium (az NF szerinti 62. stádium és a farok teljes felszívódása közötti időszak) és NF szerinti 66. stádium után (lárvakor utáni időszak). A 20 %-ot meghaladó mortalitási arány egyaránt jelezhet nem megfelelő vizsgálati körülményeket vagy a vizsgálati vegyi anyag nyilvánvaló toxikus

▼M8

hatását. Az állatok általában az ívást követő fejlődési szakasz első néhány napján és az átalakulás tetőpontján a legérzékenyebbek a nem vegyi anyagok által kiváltott, mortalitást okozó eseményekre. Az ilyen jellegű mortalitást kitűnik a kontrolladatokból.

39. Ezenfelül fel kell jegyezni a megfigyelt abnormális viselkedést, szabad szemmel látható fejlődési rendellenességeket (pl. a gerincferdülést) vagy léziókat. A gerincferdüléses eseteket meg kell számlálni (gyakoriság) és súlyosság szerint osztályozni kell (pl. nem észrevehető – NR, enyhe – 1, mérsékelt – 2, súlyos – 3; 8. függelék). A vizsgálat teljes időszaka alatt erőfeszítéseket kell tenni annak érdekében, hogy korlátozzák (pl. a kontrollokban 10 % alá szorítsák) a mérsékelt és a súlyos gerincferdülés előfordulását, ugyanakkor a kontrollcsoportban megfigyelt rendellenességek gyakoribb előfordulása nem feltétlenül ad okot a vizsgálat leállítására. A lárva fázisban lévő állatok normális viselkedését a következők jellemzik: az állatok a vízoszlopban lebegnek, farkuk a fejük fölé emelkedik, a farokúszójuk egyenletesen, ritmikusan mozog, időszakonként a felszínre emelkednek, a kopoltyúfedőjük mozog, és reagálnak az ingerekre. Kóros viselkedés például ha az állat a víz felszínén lebeg, a tartály alján fekszik, fordítva vagy szabálytalanul úszik, nem emelkedik fel a felszínre, vagy nem reagál az ingerekre. Az átalakulási fázison átesett állatok esetében a fenti rendellenes viselkedések mellett fel kell jegyezni a táplálékfogyasztásban a kezelések között mutatkozó jelentős eltéréseket is. A jelentős fejlődési rendellenességek és elváltozások közé tartoznak többek között a morfológiai rendellenességek (pl. végtagdeformitások), a haemorrhagiás léziók, a hasi ödéma és a bakteriális vagy gombás fertőzések. A növendékek fején, az orrlyukak hátulsó részén látható léziók elégtelen páratartalomra utalhatnak. Ezek minőségi megállapítások, amelyeket a betegségek vagy stressz okozta klinikai tünetekhez hasonlóan kell mérlegelni, és a kontrollállatokkal összehasonlításban kell megtenni. Ha a rendellenességek előfordulási aránya nagyobb az expozíciós tartályokban, mint a kontrollokban, akkor ezt a nyilvánvaló toxicitás bizonyítékának kell tekinteni.

Részmintavétel lárva szakaszban

A lárva szakaszban végzett részmintavétel sémája:

40. Az NF szerinti 62. stádiumot elért ebihalakat eltávolítják a tartályokból, és vagy felhasználják őket a mintavételhez, vagy a kezelés következő szakaszában való részvételhez új tartályba helyezik, illetve egy elválasztó segítségével ugyanazon tartályon belül fizikailag elkülönítik a többi ebihaltól. Az ebihalakat naponta ellenőrzik, és feljegyzik a vizsgálat azon napját, amelyen az egyes ebihalak elérték az NF szerinti 62. stádiumot. Ezt az időpontot a fej alakja alapján határozzák meg. Amint a fej mérete oly mértékben csökkent, hogy szemmel láthatóan körülbelül ugyanolyan széles, mint az ebihal törzse, és a mellső végtagok a szív középső részével egy vonalban helyezkednek el, az egyedek úgy tekinthetők, hogy elérték az NF szerinti 62. stádiumot.

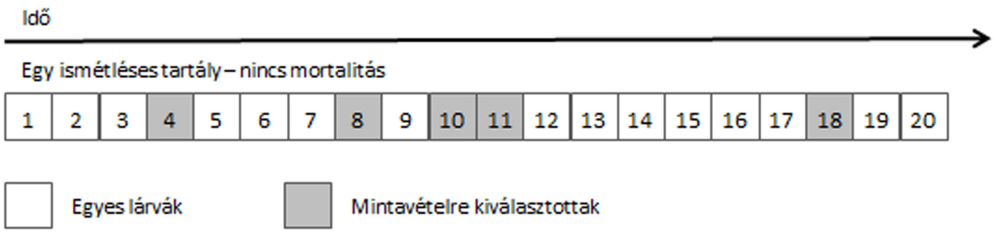
41. Arra kell törekedni, hogy tartályonként (ismétlésenként) összesen öt NF szerinti 62. stádiumban lévő ebihaltól vegyenek mintákat. A mintavételt véletlenszerűen kell végrehajtani, viszont előre ki kell jelölni az ebihalakat. Egy adott tartályban végzett mintavétel elméleti példája látható az **1. ábrán**. Amennyiben valamely tartály 20 túlélő ebihalat tartalmaz abban az időpontban, amikor az első egyed eléri az NF szerinti 62. stádiumot, véletlenszerűen meg kell határozni 5 egy és húsz közé eső számot. Az 1. ebihal az első egyed, amelyik elérte az NF szerinti 62. stádiumot, a 20. ebihal pedig az az egyed, amelyik a tartályban utolsóként érte el az NF szerinti 62. stádiumot. Hasonlóképpen, ha 18 túlélő lárva van egy adott tartályban, akkor véletlenszerűen meg kell határozni 5 egy és tizennyolc közé eső számot. Ezt a műveletet minden egyes tartály esetén el kell végezni, amikor az első vizsgált egyed eléri az NF szerinti 62. stádiumot. Amennyiben az NF

▼M8

szerinti 62. stádiumban zajló mintavétel során hullanak el egyedek, a maradék minták pozícióját véletlenszerűen meg kell változtatni attól függően, hogy hány lárva nem érte még el az NF szerinti 62. stádiumot és még hány mintára van szükség az adott ismétlés összesen öt mintájának eléréséhez. Azon a napon, amikor egy ebihal eléri az NF szerinti 62. stádiumot, az elkészített mintavételi terv alapján meg kell határozni, hogy a szóban forgó egyedet fel kell használni a mintavételhez, vagy a további kezelés céljából fizikailag el kell különíteni a többi ebihaltól. Az 1. ábrán szereplő példa alapján az NF szerinti 62. stádiumot elsőként elért egyedet (amelyet az 1. mező jelez) fizikailag elkülönítik a többi lárvától, hogy továbbra is részt vegyen a kezelésben, és feljegyzik a vizsgálat azon napját, amikor elérte az NF szerinti 62. stádiumot. Ezt követően (ugyanezen példa alapján) a 2. és a 3. számú egyeddel hasonlóképpen járnak el, mint az 1. számúval, majd a 4. számú egyedet kiválasztják mintavételre, hogy megvizsgálják növekedését és pajzsmirigy szöveteit. Ezt az eljárást addig folytatják, amíg a 20. egyedet be nem sorolják az NF szerinti 62. stádiumot elért többi egyed vagy a mintavételhez használt egyedek közé. Az alkalmazott véletlenszerű eljárásnak biztosítania kell, hogy minden vizsgálatban részt vevő szervezet egyenlő valószínűséggel legyen kiválasztható. Ez bármely randomizálási eljárással elérhető, feltéve, hogy az NF szerinti 62. stádium részmintavételi időszaka során hálóba fogják az összes ebihalat.

1. ábra

Az NF szerinti 62. stádiumban végzett mintavételi eljárás egy tartályra vonatkozó elméleti példája



42. A lárva szakaszban zajló részmintavétel során a következő végpontokat értékelik: (1) az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges idő (azaz a megtermékenyítés és az NF szerinti 62. stádium elérése között eltelt napok száma), (2) külső rendellenességek, (3) morfometria (pl. testtömeg és testhossz) és (4) pajzsmirigy szövettan.

Az ebihalak humánus elpusztítása

43. Az NF szerinti 62. stádiumban lévő ebihalak részmintáját (ismétlésenként 5 egyedet) el kell altatni, úgy, hogy 30 percre megfelelő mennyiségű (pl. 500 ml) érzéstelenítő oldatba (pl. 0,3 %-os MS-222 oldat, trikain-metánszulfonát, CAS-száma: 886-86-2) merítik őket. Az MS-222 oldatot nátrium-hidrogénkarbonáttal pufferelni kell, hogy az oldat pH-értéke körülbelül 7,0 legyen, mert a nem pufferelt MS-222 oldat savassága irritálja a béka bőrét, ami gyenge abszorbanciához vezet, az pedig az élőlényeket szükségtelen további stressznek teszi ki.

44. A vizsgálati kamrából merítőhálóval eltávolítanak egy ebihalat, és áthelyezik a végleges elaltatást biztosító oldatba. Az állat akkor kerül megfelelően elaltatott és boncolásra kész állapotba, amikor nem reagál az olyan külső ingerekre, mint hátsó végtagjának fogóval való megfogása.

Morfometria (testtömeg és testhossz)

45. A nedves tömeget (a legközelebbi mg-ra kerekítve) és a farok nélküli testhosszt (a legközelebbi 0,1 mm-re kerekítve) minden ebihal esetében közvetlenül azután kell mérni, hogy az állat az altatás következtében elveszti reakcióképességét (2a. ábra). A farok nélküli testhossz mérhető fénykép alapján

▼M8

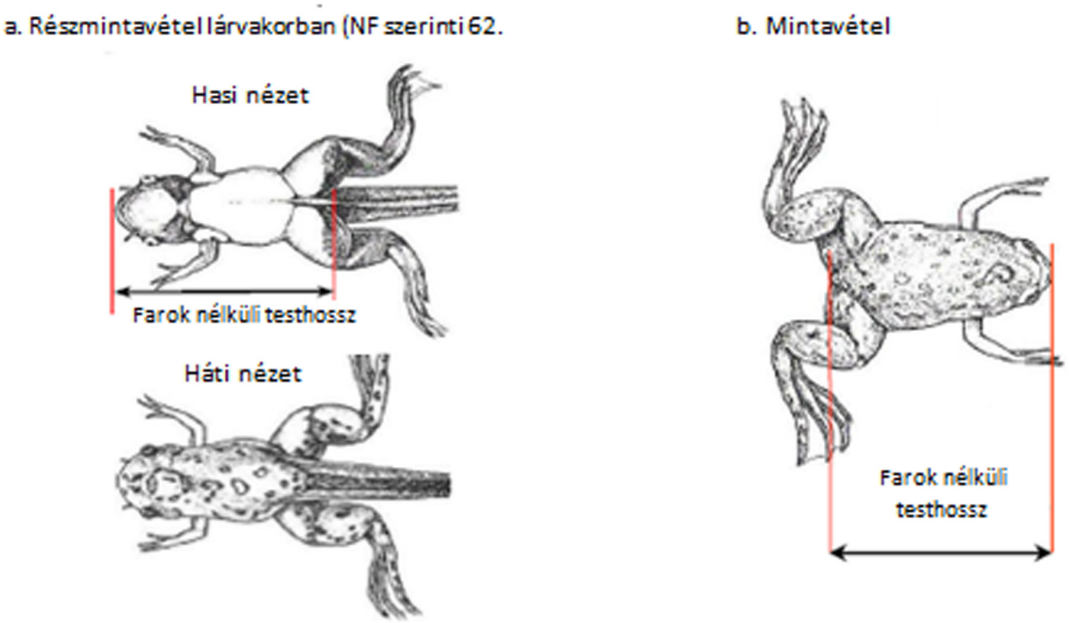
is, képelemző szoftver használatával. Az ebihalakról a mérés előtt szárazra itatással el kell távolítani a rájuk tapadt felesleges vizet. A testméret (testsúly és farok nélküli testhossz) meghatározását követően fel kell jegyezni az esetleges jelentős morfológiai rendellenességeket és/vagy a toxicitás klinikai tüneteit, például a gerincferdülést (lásd a 8. függeléket), a petechiákat és a vérzést, digitális fénykép készítése ajánlott. A petechiák a véredényekből származó apró vörös vagy lila vérömlenyek.

A szövetek gyűjtése és fixálása

46. A lárva szakaszban zajló részmintavétel során értékelik a pajzsmirigy szöveteket. A törzs alsó, mellső végtagok mögötti részét eltávolítják. A csonkolt testet Davidson-féle fixálószerben fixálják. Az edénybe helyezett fixálószer mennyisége legalább 10-szerese legyen a szövetek közelítőleges térfogatának. A vizsgálat tárgyát képező szövetek megfelelő fixálása érdekében a fixálószert kellő mértékben kevergetni vagy keringetni kell. Az összes szövet legalább 48, legfeljebb 96 órán át Davidson-féle fixálószerben tartják, ezt követően ionmentesített vízben átmossák és 10 %-os semleges pufferelt formalinba helyezik őket (1) (29).

Pajzsmirigy szövetvizsgálata

47. A lárva szakaszból származó mintákon (fixált szöveteken) el kell végezni a pajzsmirigyek szövettani értékelését, vagyis diagnózist kell felállítani és meg kell határozni a súlyossági fokot (29) (30).



2. ábra: A LAGDA során a farok nélküli testhossz méréséhez használt jellemzők az NF szerinti 62. stádiumban a) és a növendék békáknál b). Az NF szerinti 62. stádium megállapításához használt jellemzők a): a fej a törzzsel megegyező szélességű, a szaglóideg hossza rövidebb a szaglógumó átmérőjénél (háti nézet), és a mellső végtagok a szívvel egy vonalban helyezkednek el (hasi nézet). A képek Nieuwkoop és Faber (1994) művéből származnak.

A lárvák kezelésének vége

48. Az ebihalak kezdeti számát figyelembe véve várhatóan az egyedek egy kisebb hányada nem fog normálisan fejlődni, és észszerű időn belül nem fejezi be az átalakulást (az NF szerinti 66. stádium). A kezelés lárva szakasza

▼M8

nem lépheti túl a 70 napot. Az ezen időszak végéig fennmaradó ebihalakat el kell altatni (lásd a 43. pontot), meg kell mérni nedves tömegüket és farok nélküli testhosszukat, Nieuwkoop és Faber, 1994 leírása szerint meg kell határozni stádiumukat, és fel kell jegyezni esetlegesen tapasztalt fejlődési rendellenességeiket.

Az NF szerinti 66. stádium utáni selejtezés

49. Az NF szerinti 66. stádiumtól (a farok teljes felszívódásától) tartályonként tíz egyed folytatja a vizsgálatot a kezelés végéig. Ezért miután valamennyi állat elérte az NF szerinti 66. stádiumot vagy 70 nap után (amelyik hamarabb bekövetkezik), selejtezést végeznek. Az NF szerinti 66. stádiumot elért állatok közül véletlenszerűen választják ki azokat, amelyek nem vesznek részt a további kezelésben.

50. Azokat az állatokat, amelyeket nem választják ki a vizsgálatban való további részvételre, elaltatják (lásd a 43. pontot). Minden állat esetében meghatározzák a fejlődési stádiumát, nedves tömegét és farok nélküli testhosszát (2b. ábra), továbbá makroszkópos boncolást végeznek rajtuk. Az ivarmirigy morfológiája alapján megállapított fenotípusos ivart – amely lehet nőstény, hím vagy meghatározhatatlan – feljegyzik.

Mintavétel növendék szakaszban

A növendék szakaszban végzett mintavétel sémája

51. A fennmaradó állatok kezelését folytatják a hígítóvizes kontroll (és/vagy oldószeres kontroll, ha végeztek ilyet) NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges, átlagos időtartamát követő 10 hétig. Az expozíciós időszak végén a fennmaradó állatokat (ismétlésenként legfeljebb 10 békát) elaltatják, majd a különböző végpontokat megmérik vagy értékelik és feljegyzik: (1) morfometria (testtömeg és testhossz), (2) fenotípusos/genotípusos ivararányok, (3) a máj tömege (hepato-szomatikus index), (4) kórszövettan (ivarmirigyek, reproduktív vezetékek, máj és vese), valamint opcionálisan (5) a vérplazma VTG-szintje.

A békák humánus elpusztítása

52. A növendék mintákat, az átalakuláson átesett békákat hasüregbe adott érzéstelenítő injekcióval – pl. 10 % MS-222-tartalmú, megfelelő foszfátpuffert tartalmazó oldat – elaltatják. A békákat azután lehet mintavételhez felhasználni, hogy elveszítették reakcióképességüket (általában a befecskendezés után kb. 2 perccel, ha 10 %-os MS-222-t használnak békánként 0,01 ml/g koncentrációban). Bár a növendék békákat be lehetne meríteni egy magasabb koncentrációjú érzéstelenítőbe (MS-222), a tapasztalat azt mutatja, hogy ezzel a módszerrel hosszabb ideig tart az érzéstelenítés, és ez az időtartam nem mindig megfelelő mintavételhez. A befecskendezés hatékony és gyors eutanáziát biztosít a mintavétel előtt. A mintavétel nem kezdhető meg az előtt, hogy ellenőrizték a békák reakcióhiányát, ezáltal biztosítható ugyanis, hogy az állatok ténylegesen halottak legyenek. Ha a békákon jelentős mértékű szenvedésre utaló jelek figyelhetők meg és elhullásközeli állapotban vannak (súlyosan szenvednek és az elhullásukat megbízhatóan előre lehet jelezni), az állatokat érzésteleníteni kell és el kell altatni, és adatelemzés szempontjából mortalitásként kell kezelni. A betegség miatt elaltatott békákat fel kell jegyezni és fel kell tüntetni a jegyzőkönyvben. Attól függően, hogy a békákat a vizsgálat mely szakaszában altatják el, a békákon kórszövettani elemzést végezhetnek (a békákat fixálhatják az esetleges kórszövettani elemzéshez).

Morfometria (testtömeg és testhossz)

53. A nedves tömeget és farok nélküli testhosszt (2b. ábra) a lárva szakaszban zajló részmintavétellel azonos módon mérik.

▼M8

A vérplazma VTG-szintje (választható)

54. A VTG egy széles körben elfogadott biomarker, amely ösztrogénhatású vegyi anyagokkal szembeni kitettség következtében jelenik meg. A LAGDA során a vérplazma VTG-szintje a növendék mintákban igény szerint mérhető (ez különösen a gyaníthatóan ösztrogén vizsgálati vegyi anyagok esetében lehet releváns).

55. Az elaltatott növendék hátsó végtagjait lemetszik, és a vért heparinnal kezelt kapilláriscsővel felfogják (bár alkalmasak lehetnek más vérvételi módszerek is, például a szívpunkció). A vért mikrocentrifuga csőbe töltik (pl. 1,5 ml mennyiségben) és a vérplazma kinyeréséhez centrifugálják. A plazmamintákat a VTG-szint megállapításáig –70 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tárolják. A vérplazma VTG-koncentrációja mérhető enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálati (ELISA) eljárással (6. függelék) vagy egy alternatív módszerrel, például tömegspektrometriával (31). A nagyobb érzékenység miatt fajspecifikus ellenanyagok használata ajánlott.

Genetikai ivarmeghatározás

56. Az egyes növendék békák genetikai ivarának felmérése a Josimoto és munkatársai által kifejlesztett markereken alapul (11). A genetikai ivar meghatározásához a boncolás során eltávolított egyik hátsó végtag (vagy bármely más szövet) részét vagy egészét begyűjtik és egy mikrocentrifuga csőben tárolják (békák esetében bármely szövetből vehető szövetminta). A szövet a dezoxiribonukleinsav (DNS) izolálásig –20 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tárolható. A DNS kereskedelmi forgalomban kapható kittekkel izolálható a szövetekből, a marker jelenlétének vagy hiányának elemzése pedig egy polimeráz láncreakciót (PCR) alkalmazó módszerrel végezhető el (5. függelék). A kontrollcsoportokban a növendékektől történő mintavétel időpontjában az állatok szövetminta alapján meghatározott ivara és genotípusa általában 95 % feletti egyezést mutat.

Szövetek gyűjtése és fixálása kórszövettani vizsgálathoz

57. Az utolsó mintavétel során a szövettani elemzéshez begyűjtik az ivarmirigyeket, a reproduktív vezetékeket, a vesét és a májat. A hasüreget felnyitják, a májat kimetszik és megmérik a tömegét. Ezt követően az alhasból óvatosan eltávolítják az emésztőszerveket (pl. a gyomrot, a beleket), így feltárulnak az ivarmirigyek, a vesék és a reproduktív vezetékek. Az ivarmirigyek jelentős morfológiai rendellenességeit fel kell jegyezni. Végül eltávolítják a hátsó végtagokat, ha a vérvételhez korábban még nem távolították el őket. A begyűjtött májat és a testet a helyükön hagyott ivarmirigyekkel haladéktalanul Davidson-féle fixálószerbe kell helyezni. Az edénybe helyezett fixálószer mennyisége legalább 10-szerese legyen a szövetek közelítőleges térfogatának. Az összes szövet legalább 48, legfeljebb 96 órán át Davidson-féle fixálószerben tartják, ezt követően ionmentesített vízben átmossák és 10 %-os semleges pufferelt formalinba helyezik őket (1) (29).

Kórszövettan

58. Az egyes növendékmintákon szövettani vizsgálatot végeznek az ivarmirigyek, a reproduktív vezetékek, a vese és a máj szövetein jelentkező kóros elváltozások megállapításához, vagyis diagnózist kell felállítani és meg kell határozni a súlyossági fokot (32). Az értékelés során meghatározzák az ivari fenotípust is (pl. petefészek, here, interszexualitás alapján), és az egyedek genetikai ivarát meghatározó mérésekkel együtt ezek a megfigyelések felhasználhatók a fenotípusos/genotípusos ivararányok kiszámításához.

▼M8

ADATOK ÉS JELENTÉS

Statisztikai elemzés

59. A LAGDA során három statisztikai elemzésnek alávetett adattípus keletkezik: (1) kvantitatív folytonos adatok (testtömeg, farok nélküli testhossz, máj szomatikus index, VTG), (2) a fejlődési ütemre vonatkozó, „eseményig eltelt időt” jelző adatok (vagyis a vizsgálat kezdetétől az NF szerinti 62. stádium eléréséig eltelt napok) és (3) a kórszövettani vizsgálatokból származó sorrendi adatok, azaz a súlyossági pontszámok és a fejlődési stádiumok.

60. Ajánlatos a vizsgálati tervet úgy kialakítani és olyan statisztikai vizsgálatot választani, hogy a biológiai szempontból fontos változásokat az olyan végpontokon, ahol megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációt vagy ECx koncentrációt kell jelenteni, megfelelő statisztikai erővel lehessen észlelni. Az adatok (általában az ismétlések átlagán nyugvó) statisztikai elemzéséhez lehetőség szerint az „Aktuális megközelítések az ökotoxicitási adatok statisztikai elemzésében: alkalmazási útmutató” (33) című dokumentumban leírt eljárásokat kell követni. A vizsgálati módszer 7. függeléke tartalmazza a javasolt statisztikai elemzési folyamatábrát, és útmutatást nyújt az adatok kezeléséhez, valamint a LAGDA során alkalmazandó legmegfelelőbb statisztikai vizsgálat vagy modell kiválasztásához.

61. Mivel minden béka esetében meghatározzák a genotípusos ivart, a növendékmintákból nyert adatokat (pl. növekedés, máj szomatikus index) genotípusos ivaronként külön kell elemezni.

Adatelemzési szempontok

Érvénytelen ismétlések és kezelések használata

62. A nyilvánvaló toxicitásból, betegségből vagy technikai hibából fakadó túlzott mértékű mortalitás érvénytelenné teheti az ismétléseket és kezeléseket. Amennyiben valamely kezelés betegség vagy technikai hiba következtében érvénytelennél válik, legalább három – három érvényes ismétlést bevonó – kezelésnek rendelkezésre állnia az elemzéshez. Ha a legmagasabb dózisú kezelés(ek)nél nyilvánvaló toxicitás tapasztalható, az elemzéshez lehetőség szerint biztosítani kell legalább három, három érvényes ismétléssel rendelkező kezelési szintet (összhangban az OECD vizsgálati iránymutatásainak legnagyobb elviselhető koncentrációra vonatkozó megközelítésével (34)). A mortalitáson túl nyilvánvaló toxicitásra utaló jelek lehetnek a viselkedést érintő hatások (pl. az élőlény a víz felszínén lebeg, a tartály alján fekszik, fordítva vagy szabálytalanul úszik, nem emelkedik fel a felszínre), a morfológiai léziók (pl. haemorrhagiás léziók, hasi ödéma), illetve a normál táplálkozási válaszreakciók gátlása a kontrollállatokkal való kvalitatív összevetésben.

Oldószeres kontroll

63. Oldószer alkalmazása esetén a vizsgálat befejezésekor értékelni kell az oldószer lehetséges hatásait. Ezt az oldószeres kontrollcsoport és a hígítóvizes kontrollcsoport statisztikai összehasonlítása útján végzik el. A legfontosabb vizsgálandó végpontok az elemzés során a növekedés meghatározói (tömeg és hossz), mivel az általános toxicitás ezeket tudja befolyásolni. Ha statisztikailag szignifikáns különbségeket mutatnak ki a hígítóvizes és az oldószeres kontrollcsoportok között e végpontok tekintetében, a legjobb szakmai megítélés alapján kell dönteni arról, hogy érvénytelennek tekinthető-e a vizsgálat. Amennyiben a két kontroll között eltérések tapasztalhatók, a vegyi anyaggal végzett kezeléseket az oldószeres kontrollal kell összevetni, kivéve ha ismert, hogy a hígítóvízzel való összehasonlítást részesítik előnyben. Amennyiben a két kontrollcsoport között nincs statisztikailag szignifikáns különbség, ajánlatos a vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezeléseket az összevont oldószeres és hígítóvizes kontrollcsoportokkal összevetni, kivéve ha ismert, hogy a hígítóvizes vagy az oldószeres kontrollcsoporttal való összehasonlítást részesítik előnyben.

▼M8

Vizsgálati jegyzőkönyv

64. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati vegyi anyag:

— fizikai jelleg és adott esetben a fizikai és kémiai tulajdonságok,

— Egy összetevőből álló anyag:

fizikai megjelenés, vízoldékonyság és a további releváns fizikai-kémiai tulajdonságok;

kémiai azonosító adatok, például IUPAC- vagy CAS-név, CAS-szám, SMILES- vagy InChI-kód, szerkezeti képlet, tisztaság, valamint adott esetben és amennyiben a gyakorlatban megvalósítható, a szennyeződések kémiai azonosítója stb. (ideértve adott esetben a szervesszén-tartalmat).

— Több összetevőből álló anyag, UVCB-k és keverékek:

amennyiben lehetséges, az összetevők kémiai azonosítójával (lásd fent), mennyiségi előfordulásával és releváns fizikai-kémiai tulajdonságaival jellemezve.

Vizsgálati fajok:

— tudományos név, törzs (ha meghatározható), forrás és a megtermékenyített peték begyűjtésének módja, valamint a későbbi kezelés;

— a gerincferdülés előfordulása az alkalmazott törzstenyészet dokumentált kontrolljaiban.

Vizsgálati körülmények:

— megvilágítási időszak(ok);

— vizsgálati terv (pl. a kamra mérete, az anyagok és a víz mennyisége, a vizsgálati kamrák és az ismétlések száma, a vizsgált élőlények létszáma az ismétlésekben);

— a törzsoldat elkészítésének módszere és a vízcsere gyakorisága (az esetleg használt diszpergálószer nevét és koncentrációját meg kell adni);

— a vizsgálati vegyi anyag adagolásának módszere (például szivattyú, hígítási rendszerek);

— a módszer visszanyerési hatékonysága és a névleges vizsgálati koncentrációk, a meghatározási határ, a mért értékek átlaga és szórása a vizsgálati edényekben, az ilyen adatok megszerzésének módszerei és bizonyítékok annak alátámasztására, hogy a mérések a valódi oldatban lévő vizsgálati vegyi anyag koncentrációszintjeire vonatkoznak;

— a hígítóvíz jellemzői: pH-érték, keménység, hőmérséklet, oldottoxigén-koncentráció, maradékklór-tartalom (amennyiben mérik), összes jód, teljes szervesszén-tartalom (amennyiben mérik), szuszpendált szilárd anyagok (amennyiben mérik), a vizsgálati közeg sótartalma (amennyiben mérik) és bármely más mérési adat;

— a névleges vizsgálati koncentrációk, a mért értékek átlaga és ezek standard deviációja;

— vízminőség a tesztedényekben: pH-érték, (napi) hőmérséklet és oldottoxigén-koncentráció;

▼M8

— részletes információk a táplálékról (pl. a haltápok típusa, eredete, az adagolt mennyiség és az adagolás gyakorisága).

Eredmények:

— Bizonyíték arra, hogy a kontrollok teljesítették az érvényességi kritériumokat;

— a kontroll (és alkalmazása esetén az oldószeres kontroll) és a kezelt csoportok következő adatai: a megfigyelt mortalitás és rendellenességek, az NF szerinti 62. stádium eléréséig szükséges idő, a pajzsmirigy szövettani vizsgálata (csak a lárvamintáknál), növekedés (tömeg és hossz), máj szomatikus index (csak a növendékmintáknál), genetikai/fenotípusos ivararányok (csak a növendékmintáknál), az ivarmirigyek, a reproduktív vezetékek, a vese és a máj kórszövettani vizsgálatának eredményei (csak a növendékmintáknál) és a vérplazma VTG-szintje (csak a növendékmintáknál, ha végeztek ilyen mérést);

— a statisztikai elemzés és az adatok feldolgozása során alkalmazott megközelítés (az alkalmazott statisztikai vizsgálat vagy modell);

— megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve;

— megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC) minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve ($\alpha = 0{,}05$ értéknél); ECx adott esetben minden egyes kiértékelt válaszreakcióra nézve, konfidencia-intervallumok (például 95 %) és a számításhoz használt illesztett modell grafikonja, a koncentráció–hatás görbe meredeksége, a regressziós modell egyenlete, a modell becsült paraméterei és a becslés standard hibái.

— a vizsgálati módszertől való eltérések, az elfogadhatósági kritériumoktól való eltérések, és a vizsgálat kimenetelére gyakorolt lehetséges hatásukkal kapcsolatos megfontolások.

65. A végpontmérések eredményeit illetően fel kell tüntetni az átlagértékeket és az azoktól való standard deviációt (lehetőség szerint az ismétlések és a koncentrációk alapján).

66. A kontrolloknál az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamot az ismétlések átlaga és szórása alapján kell kiszámolni és bemutatni. Hasonlóképpen a kezelések esetén egy adott kezelés átlagát az ismétlések átlaga és szórása alapján kell kiszámolni és bemutatni.

SZAKIRODALOM

(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) Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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 1 130: 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: 1 565.

(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: 2 469-2 474.

(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) E melléklet C.4., Gyors biológiai lebonthatóság című fejezete.

(18) E melléklet C.29., Gyors biológiai lebonthatóság: szén-dioxid-vizsgálat légmentesen zárt edényekben (a gőztér CO_2-tartalmának vizsgálata) című fejezete.

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.

(24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.

(25) E melléklet C.38., Kétéltű-átalakulási vizsgálat című fejezete.

(26) E melléklet C.48., Halak rövid távú reprodukciós vizsgálata című fejezete.

(27) E melléklet C.41., Halak ivari fejlődésének vizsgálata című fejezete.

(28) E melléklet C.49., Halembriók akut toxicitási vizsgálata (FET) című fejezete.

(29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(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), Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet, Párizs.

(34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

▼M8

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Apikális végpont: populációszintű hatás előidézése.

Vegyi anyag: anyag vagy keverék.

ELISA: enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay).

ECx: (hatásos koncentráció x % hatás eléréséhez) az a koncentráció, amely valamely hatás x %-át okozza a vizsgálati szervezetekben egy adott expozíciós időn belül, a kontrollal összehasonlítva. Például az EC50 az a becsült koncentráció, amely a vizsgálat valamilyen végpontja tekintetében a kitett populáció 50 %-ában okoz hatást a meghatározott expozíciós idő alatt.

dpf: a megtermékenyítés utáni napok száma.

Átfolyásos vizsgálat: az expozíció során a vizsgálati oldat vizsgálati rendszeren történő folyamatos áramlása mellett folytatott vizsgálat.

HPG-tengely: hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Elméleti és Alkalmazott Kémia Nemzetközi Uniója).

Megfigyelhető hatást okozó legalacsonyabb koncentráció (LOEC): a vizsgálati vegyi anyag azon legalacsonyabb vizsgálati koncentrációja, amelynél a kontrollal összevetve még megfigyelhető a vegyi anyag statisztikailag szignifikáns hatása ($p < 0,05$). Azonban az LOEC-szint feletti valamennyi vizsgálati koncentrációnak olyan ártalmas hatást kell kifejtenie, amely legalább egyenlő az LOEC-szinten megfigyelttel vagy súlyosabb annál. Amennyiben e két feltétel nem teljesíthető, akkor kimerítő magyarázatot kell adni arra, hogy hogyan történt az LOEC (és ennélfogva az NOEC) kiválasztása. A 7. függelék útmutatást ad.

Medián letális koncentráció (LC50): a vizsgálati vegyi anyag azon koncentrációja, amely a becslések szerint a vizsgálat időtartama alatt a vizsgálati szervezetek 50 %-ára nézve halálos.

Megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC): a közvetlenül az LOEC alatti vizsgálati koncentráció, amely – a kontrollcsoporttal való összevetésben – nem fejt ki statisztikailag szignifikáns hatást ($p < 0,05$) a meghatározott expozíciós időszak alatt.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (molekulák egyszerűsített egy sorban történő beviteli rendszere).

Vizsgálati vegyi anyag: bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

UVCB: ismeretlen szerkezetű vagy változó összetételű, összetett reakcióban keletkezett vagy biológiai eredetű anyagok.

VTG: a vitellogenin a szikben található foszfo-, lipo- és glikoproteinek prekurzora, amely alapesetben az ikrarakó fajok szexuálisan aktív nőstényeiben fordul elő.

▼**M8**

2. függelék

AZ ELFOGADHATÓ MINŐSÉGŰ HÍGÍTÓVÍZ NÉHÁNY FONTOSABB KÉMIAI TULAJDONSÁGA

Anyag	Határkoncentráció
Szálló por	5 mg/l
Teljes szervesszén-tartalom	2 mg/l
Nem ionizált ammónia	1 µg/l
Maradék klór	10 µg/l
Szerves foszfort tartalmazó növényvédő szerek összesen	50 ng/l
Szerves klórtartalmú peszticidek + poliklórozott bifenilek	50 ng/l
Összes szerves klór	25 ng/l
Alumínium	1 µg/l
Arzén	1 µg/l
Króm	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Réz	1 µg/l
Vas	1 µg/l
ólom	1 µg/l
Nikkel	1 µg/l
Cink	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Higany	100 ng/l
Ezüst	100 ng/l

▼**M8**

3. függelék

A LAGDA VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEI

1. A vizsgálathoz használt fajok	*Xenopus laevis*
2. A vizsgálat típusa	Folyamatos vízcserét biztosító átfolyásos rendszer.
3. Vízhőmérséklet	A névleges vízhőmérséklet 21 °C. A vizsgálat időtartama alatt az átlagos vízhőmérséklet 21 ±1 °C (az ismétlések és a kezelések közötti különbség nem haladhatja meg az 1,0 °C-ot).
4. A megvilágítás minősége	Fluoreszcens izzók (széles spektrum) 600–2 000 lux (lumen/m^2) a víz felszínén.
5. Megvilágítási időszak	12 óra fény, 12 óra sötét.
6. Vizsgálati oldat mennyisége és vizsgálati edény (tartály)	4–10 l (legalább 10–15 cm-es vízmélység). Üveg- vagy rozsdamentes acél tartály.
7. A vizsgálati oldatok térfogatának cseréje	Állandó, a biológiai körülmények fenntartása és a vegyi anyag koncentrációja szerint (pl. napi 5 térfogatcsere).
8. A vizsgált élőlények kora a vizsgálat kezdetén	Nieuwkoop és Faber (NF) szerinti 8–10. stádium.
9. Élőlények ismétlésenkénti száma	20 állat (embrió)/tartály (ismétlés) a kezelés elindításakor és 10 állat (növendék)/tartály (ismétlés) az NF szerinti 66. stádiumtól a kezelés végéig.
10. Kezelések száma	Legalább 4 vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelés plusz a megfelelő kontroll(ok).
11. Kezelésenkénti ismétlések száma	4 ismétlés a vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelések és 8 ismétlés a kontroll(ok) esetén.
12. Élőlények száma vizsgálati koncentrációként	Legalább 80 állat a vizsgálati vegyi anyaggal végzett kezelések és legalább 160 állat a kontroll(ok) esetén.
13. Hígítóvíz	Bármely víz, amely lehetővé teszi az *X. laevis* normál növekedését és fejlődését (pl. forrásvíz vagy aktív szénen szűrt csapvíz)
14. Levegőztetés	Nem szükséges, ha viszont az oldottoxigéntartalom az ajánlott határértékek alá esik, és az áramoltatott vizsgálati oldatban maximális szinten van jelen, akkor szükség lehet a tartályok levegőztetésére.
15. A vizsgálati oldat oldottoxigén-tartalma	Oldott oxigén: a levegőtelítettségi érték legalább 40 %-a vagy legalább 3,5 mg/l

▼**M8**

16.	A vizsgálati oldat pH-értéke	6,5–8,5 (az ismétlések és a kezelések közötti különbség értéke nem haladhatja meg a 0,5-öt).
17.	A vizsgálati oldat keménysége és lúgossága	10–250 mg $CaCO_3$/l
18.	Etetési rend	(Lásd a 4. függeléket).
19.	Expozíciós időtartam	Az NF szerinti 8–10. stádiumtól a vizes és/vagy oldószeres kontrollcsoportban az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartamot követő 10 hétig (legfeljebb 17 hét).
20.	Biológiai végpontok	Mortalitás (és rendellenes külső megjelenés), az NF szerinti 62. stádium eléréséig szükséges idő (lárvamintáknál), a pajzsmirigy szövettani vizsgálata (lárvamintáknál), növekedés (tömeg és hossz), hepato-szomatikus index (növendékmintáknál), genetikai/fenotípusos ivararányok (növendékmintáknál), az ivarmirigyek, a reproduktív vezetékek, a vese és a máj kórszövettani eredményei (növendékmintáknál) és a vérplazma vitellogeninszintje (növendékmintáknál, választható).
21.	A vizsgálat érvényességi kritériumai	Az oldott oxigén szintjének meg kell haladnia a levegőtelítettségi érték 40 %-át; az átlagos vízhőmérsékletnek a 21 ±1 °C-os tartományban kell lennie, az ismétlések és a kezelések közötti különbség nem haladja meg az 1,0 °C-ot; a vizsgálati oldat pH-értékének 6,5 és 8,5 között kell lennie; a kontrollok minden ismétlésében a mortalitás legfeljebb 20 %-os lehet és a kontrollnál az NF szerinti 62. stádium eléréséhez szükséges átlagos időtartam legfeljebb 45 nap lehet; a kontrollokban és az oldószeres kontrollokban (ha végeztek ilyet) a vizsgált élőlények átlagos testtömegének az NF szerinti 62. stádiumban el kell érnie az 1,0 ±0,2 g-ot, a vizsgálat végén pedig a 11,5 ±3 g-ot; bizonyítékkal kell alátámasztani, hogy a vizsgálati vegyi anyag oldatban lévő koncentrációit az átlagos mért értékek ±20 %-os tartományán belül sikerült tartani.

▼M8

4. függelék

ETETÉSI REND

Megjegyzendő, hogy bár ez az ajánlott etetési rend, alternatív megoldások is alkalmazhatók, amennyiben biztosítják a vizsgálati élőlények megfelelő ütemű növekedését és fejlődését.

A lárvák etetése

A lárvák táplálékának előkészítése

A. 1: 1 térfogatszázalék arányban ivadékindító pisztrángtáp: alga/TetraFin® (vagy ezzel egyenértékű táp);

1. Ivadékindító pisztrángtáp: turmixoljunk össze 50 g (apró szemcsés vagy porított) ivadékindító pisztrángtápot és 300 ml kellően átszűrt vizet 20 percen keresztül egy magas fokozatra állított turmixgépben.

2. Alga/TetraFin® (vagy ezzel egyenértékű) keverék: turmixoljunk össze 12 g spirulina algakorongot és 500 ml szűrt vizet 40 másodpercig egy magas fokozatra állított turmixgépben, turmixoljunk össze 12 g Tetrafin® (vagy ezzel egyenértékű) tápot 500 ml szűrt vízzel, majd a két keveréket összeöntve 1 liternyi 12 g/l spirulina algát és 12 g/l Tetrafin® (vagy ezzel egyenértékű) tápot tartalmazó keveréket kapunk.

3. Öntsünk össze azonos mennyiségű összeturmixolt ivadékindító pisztrángtápot és alga/TetraFin® (vagy ezzel egyenértékű) keveréket.

B. Sórák:

Keltessünk ki 15 ml sórákpetét 1 liter sós vízben (amelyet úgy készíthetünk el, hogy 1 liter ionmentesített vízhez hozzáadunk 20 ml NaCl-ot). Miután folyamatos világítás mellett szobahőmérsékleten 24 órán keresztül levegőztettük a vizet, begyűjthetjük a kikelt sórákokat. Ehhez 30 percre állítsuk le a levegőztetést, hogy a sórákok leülepedjenek az edény aljára. A sórákpeték edény tetején lebegő burkát leöntjük és eltávolítjuk, a sórákokat pedig a megfelelő szűrőkkel leszűrjük és 30 ml szűrt vízzel a felszínre hozzuk.

Etetési protokoll

Az 1. táblázat támpontot nyújt a kezelés lárva stádiumaiban használandó táplálék típusához és mennyiségéhez. Az állatokat hétfőtől péntekig napi három alkalommal, hétvégén napi egy alkalommal kell etetni.

1. táblázat

Átfolyásos körülmények között nevelt *X. laevis* lárvák etetési rendje

Időszak (*) (a megtermékenyítéstől számítva)	Ivadékindító pisztrángtáp: alga/TetraFin® (vagy ezzel egyenértékű táp)		Sórák	
	Hétköznap (napi 3 alkalommal)	Hétvégén (napi egy alkalommal)	Hétköznap (napi két alkalommal)	Hétvégén (napi egy alkalommal)
4–14. nap (0–1. hét)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (8–15. nap) 1 ml (a 16. naptól)	0,5 ml (8–15. nap) 1 ml (a 16. naptól)
2. hét	0,67 ml	2,4 ml		
3. hét	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
4. hét	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
5. hét	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml

▼M8

Időszak (*) (a megtermékenyítéstől számítva)	Ivadékindító pisztrángtáp: alga/TetraFin® (vagy ezzel egyenértékű táp)		Sórák	
	Hétköznap (napi 3 alkalommal)	Hétvégén (napi egy alkalommal)	Hétköznap (napi két alkalommal)	Hétvégén (napi egy alkalommal)
6. hét	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
7. hét	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
(8–10. hét)	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) A 0. nap a hCG injekció beadásának napja.

Áttérés a lárvák táplálásáról a növendékek táplálására

Az átalakulás folyamata során a lárvák az alábbiakban ismertetett módon áttérnek a növedékek étrendjére. Az átmeneti időszak során a lárva táplálék csökkentésével párhuzamosan növelni kell a növendék táplálék mennyiségét. Ennek megvalósításához fokozatosan csökkentik a lárva táplálékot, miközben fokozatosan növelik a növendék táplálékot abban az időszakban, amikor az öt ebihalból álló egyes csoportok elhagyják az NF szerinti 62. stádiumot és közelednek az átalakulás NF szerinti 66. stádiumban bekövetkező végéhez.

A növendékek etetése

Növendékek étrendje

Az átalakulási fázis lezárultát követően (66. stádium) a táplálék kizárólag 3/32 hüvelykes prémium minőségű süllyedő békatápból (Xenopus Express™, FL, USA) vagy ezzel egyenértékű tápból áll.

Zúzott pelletek készítése a növendékké alakuló lárvák számára

A süllyedő békatáp pelletdarabjait rövid ideig kávédarálóban vagy turmixgépben őrlik, illetve mozsárban mozsártörővel apróra zúzzák, hogy a pelletek méretét körülbelül az 1/3-ára csökkentsék. A túl hosszú ideig való őrlés vagy zúzás poríthatja a pelleteket, amit el kell kerülni.

Etetési protokoll

A **2. táblázat** támpontot nyújt a növendék és a felnőtt életszakaszban használandó táplálék típusához és mennyiségéhez. Az állatokat naponta egyszer kell táplálni. Megjegyzendő, hogy az állatok az átalakulási időszak alatt továbbra is megkapják sórákadagjuk egy részét, amíg az állatok több mint 95 %-a át nem alakult.

A vizsgálat utolsó napján az állatokat már nem szabad etetni, hogy a táplálék ne befolyásolja a mért testtömeget.

2. táblázat

Átfolyásos körülmények között nevelt *X. laevis* növendékek etetési rendje. Fontos megjegyezni, hogy az át nem alakult állatok, köztük azok, amelyek átalakulását a vegyi anyaggal való kezelés késlelteti, nem tudják elfogyasztani a teljes méretű pelletdarabokat.

Időszak (*) (Az átlagos átalakulási nap utáni hetekben)	Zúzott pellet (mg/békaporonty)	Teljes méretű pellet (mg/békaporonty)
Az állatok átalakulási időszaka	25	0
0–1. hét	25	28

▼**M8**

Időszak (*) (Az átlagos átalakulási nap utáni hetekben)	Zúzott pellet (mg/békaporonty)	Teljes méretű pellet (mg/békaporonty)
2–3. hét	0	110
4–5. hét	0	165
6–9. hét	0	220

(*) A 0. hét első napja a kontrollállatok átlagos átalakulási napja.

▼M8

5. függelék

A GENETIKAI IVAR MEGHATÁROZÁSA (NEMEK GENETIKAI ÚTON TÖRTÉNŐ MEGHATÁROZÁSA)

A *Xenopus laevis* nemének genetikai úton történő meghatározása a Josimoto és munkatársai (2008) által kidolgozott módszeren alapul. A genotípus meghatározásának részletes eljárása igény szerint tanulmányozható ebben a publikációban. Alkalmasnak ítélt egyéb módszerek (pl. nagy áteresztőképességű kvantitatív polimeráz láncreakció) is használhatók.

X. laevis primerek

DM-W marker

Forward: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Reverse: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Pozitív kontroll

Forward: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Reverse: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

DNS-tisztítás

Az izom- vagy bőrszövetből a DNS tisztítható pl. Qiagen DNeasy Blood and Tissue kittel (kat.száma: 69 506) vagy hasonló termékkel, a kithez mellékelt útmutató alapján. Amennyiben a polimeráz láncreakcióhoz koncentráltabb mintákra van szükség, a DNS kevesebb puffer használatával is elulálható a forgóoszlopokból. A DNS meglehetősen stabil, ezért ügyelni kell arra, hogy elkerüljék a keresztszennyeződést, ami a hímek és a nőstények helytelen azonosításához vezethet.

Polimeráz láncreakció

Az **1. táblázat** ismerteti a Sigmától beszerezhető JumpStart™ *Taq* használatán alapuló mintaprotokollt.

1. táblázat

A Sigmától beszerezhető JumpStart™ *Taq* használatán alapuló mintaprotokoll

Reakciókeverék	1x (µl)	[Végső]
NFW (*)	11	—
10X puffer	2,0	—
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP-k (egyenként 10 mM)	0,4	200 µM
Forw. primer markere (8 µM)	0,8	0,3 µM
Rev. primer markere (8 µM)	0,8	0,3 µM
Forw. primer kontrollja (8 µM)	0,8	0,3 µM
Rev. primer kontrollja (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 egység/µl
DNS-templát	1,0	~200 pg/µl

(*) Nukleázmentes víz
Megjegyzés: A reakciókeverékek készítésekor érdemes plusz mennyiségről is gondoskodni, amivel pótolni lehet a pipettázás során bekövetkezett veszteséget (például: 24 reakcióhoz 25x-ös mennyiséget készíteni).

▼**M8**

Reakció:

Reakciókeverék	19,0 µl
Templát	1,0 µl
Összesen	20,0 µl

Hőciklus profilja:

1. lépés	94 °C	1 min
2. lépés	94 °C	30 s
3. lépés	60 °C	30 s
4. lépés	72 °C	1 min
5. lépés	Térjen vissza a 2. lépéshez.	35 ciklus
6. lépés	72 °C	1 min
7. lépés	4 °C	tárolás

A polimeráz láncreakció termékei azonnal felhasználhatók gélben, vagy tárolhatók is 4 °C-on.

Agarózgél-elektroforézis (3 %) (mintaprotokoll)

50X TAE

Tris	24,2 g
Jégecet	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Vízzel egészítsük ki 100 ml-re

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3: 1 Agaróz

3 rész NuSieve™ GTG™ agaróz

1 rész alacsony elektroendozmózisú (EEO) Fisher agaróz

Elkészítési mód

1. 1,2 g agarózkeverék 43 ml 1X TAE-hez való hozzáadásával készítsünk egy 3 %-os gélt. Kavarással oldjuk fel a nagyobb csomókat.

2. A csomók teljes feloldásához mikrohullámban melegítsük az agarózkeveréket (forralni nem szabad). Hagyjuk kissé lehűlni a keveréket.

3. Adjunk hozzá 1,0 µl etídium-bromidot (10 mg/ml). Keverjük össze a lombik tartalmát. Az etídium-bromid mutagén hatású, ezért amennyiben technikailag megoldható, a dolgozókra leselkedő egészségügyi veszélyek minimalizálása érdekében ([1]) ebben a lépésben alternatív vegyi anyagokat kell használni.

4. Öntsük a gélt egy barázdált formába. Hagyjuk teljesen lehűlni.

([1]) A munkájuk során rákkeltő anyagokkal és mutagénekkel kapcsolatos kockázatoknak kitett munkavállalók védelméről szóló, 2004. április 29-i 2004/37/EK európai parlamenti és tanácsi irányelv (hatodik egyedi irányelv a 89/391/EGK tanácsi irányelv 16. cikkének (1) bekezdése értelmében) 4.1. cikke értelmében (HL L 158., 2004.4.30., 50. o.).

▼**M8**

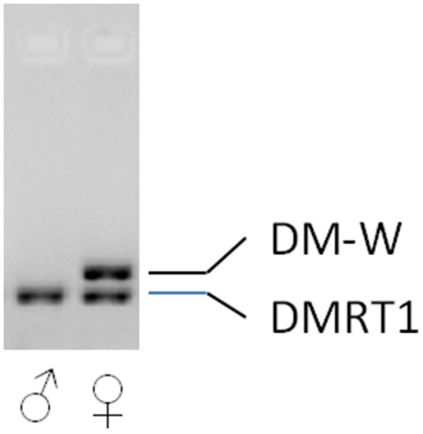
5. Öntsük bele a gélt a készülékbe. A gélre helyezzünk 1X TAE-t.

6. A polimeráz láncreakcióból származó termék minden 10 µl mennyiségéhez adjunk hozzá 1 µl 6x-os töltőfestéket.

7. Pipettával helyezzük a mintákat a barázdákba.

8. Végezzük el az elektroforézist 160 V állandó feszültségen mintegy 20 percig.

   Az **1. ábrán** látható agaróz gél kép mutatja azokat a sávmintákat, amelyek jelzik a hím és a nőstény egyedek ivarát.



1. ábra: Agaróz gél kép, amely mutatja a hím (♂) egyedre jellemző sávmintát (egy sáv, ~203 bp: DMRT1) és a nőstény (♀) egyedre jellemző sávmintát (két sáv: ~259 bp: DM-W és 203 bp:DMRT1).

SZAKIRODALOM

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2 469-2 474.

▼M8

6. függelék

A VITELLOGENIN MÉRÉSE

A vitellogenin (VTG) mérése enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálati (ELISA) eljárással történik, amelyet eredetileg az amerikai cselle VTG mérésére fejlesztettek ki (Parks és munkatársai, 1999). Jelenleg kereskedelmi forgalomban nem kaphatók ellenanyagok az *X. laevis*-hez. Figyelembe véve azonban, hogy a VTG fehérjére vonatkozólag bőséges ismeretek állnak rendelkezésre és az ellenanyagok kereskedelmi forgalomban költséghatékonyan beszerezhetők, a laboratóriumok könnyen kidolgozhatnak egy ELISA-eljárást ehhez a méréshez (Olmstead és munkatársai, 2009). Szintén Olmstead és munkatársai (2009) közzétették a vizsgálat *X. tropicalis* VTG-szintjének mérésére alkalmas, alábbiakban ismertetett módosított változatát. A módszer az *X. tropicalis* VTG-vel szemben termelt ellenanyagot használ, amelyről ismert, hogy az *X. laevis* VTG-vel szemben is alkalmazható. Megjegyzendő, hogy nem kompetitív ELISA tesztek is használhatók, ugyanakkor ezek az alábbiakban ismertetett módszernél alacsonyabb kimutathatósági határértékekkel rendelkezhetnek.

Anyagok és reagensek

— Előadszorbeált 1. ellenanyag szérum

— Keverjünk össze 1 rész *X. tropicalis* VTG-vel szemben termelt 1. ellenanyag szérumot 2 rész kontrollhímből származó vérplazmával, hagyjuk a keveréket szobahőmérsékleten kb. 75 percig, helyezzük jégre 30 percig, centrifugáljuk 20000 x g-vel 1 órán keresztül 4 ^{o}C-on, távolítsuk el a felülúszót, osszuk szét alikvotokra és tároljuk –20 ^{o}C-on.

— 2. ellenanyag

— HRP-konjugált anti-nyúl kecske IgG (pl. Bio-Rad 172-1019)

— VTG szabvány

— tisztított *X. laevis* VTG 3,3 mg/ml.

— TMB (3,3',5,5’ Tetrametil-benzidin) (pl. KPL 50-76-00; vagy Sigma T0440)

— Normál kecske szérum (NGS)(pl. Chemicon® S26-100 ml)

— 96 lyukú EIA polisztirol mikrotiterlemez (pl. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)

— 37 ^{o}C hibridizáló inkubátor (vagy gyors légkiegyenlítő inkubátor) a lemezekhez, vízfürdő a csövekhez

— Egyéb szokásos laboratóriumi műszerek, vegyi anyagok és felszerelések.

Receptek

Felvivő puffer (50 mM karbonát puffer, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
víz	428 ml

10X PBS (0,1 M foszfát, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
víz	810 ml

▼**M8**

Mosópuffer (PBST):

10X PBS	100 ml
víz	900 ml

Állítsuk be a pH-t 7,3 értékre 1 M HCl-dal, majd adjunk hozzá 0,5 ml Tween-20-t

Vizsgálati puffer:

Normál kecske szérum (NGS)	3,75 ml
Mosópuffer	146,25 ml

Mintagyűjtés

A vért heparinnal kezelt mikrohematokrit csőbe gyűjtik és jégre helyezik. Miután 3 percen keresztül centrifugálták, a csövet értékelik, felnyitják és a vérplazmát 0,13 egység liofilizált aprotinint tartalmazó 0,6 ml-es mikrocentrifuga csövekbe töltik. (Ezeket a csöveket előre elkészítik: megtöltik a megfelelő mennyiségű aprotininnel, lefagyasztják, majd gyors vákuumszárítóban alacsony hőmérsékleten száradásig lipofiziálják.) A vérplazma az elemzésig –80 °C-on tárolható.

Eljárás egy lemezhez

Felvitel a lemezre

Keverjünk össze 20 µl tisztított VTG-t 22 ml karbonát pufferrel (3 µg/ml végső koncentrációban). Helyezzünk a keverékből 200 µl-t egy 96 lyukú lemez összes lyukába. Takarjuk le a lemezt tapadós zárófóliával, és inkubáljuk 2 órán keresztül 37 °C-on (vagy egy éjszakán keresztül 4 °C-on).

A lemez blokkolása

A blokkoló oldat elkészítéséhez adjunk hozzá 2 ml normál kecske szérumot (NGS) 38 ml karbonát pufferhez. Távolítsuk el a felvivő oldatot és a lemezt rázassuk szárazra. Minden lyukhoz adjunk hozzá 350 µl blokkoló oldatot. Takarjuk le a lemezt tapadós zárófóliával, és inkubáljuk 2 órán keresztül 37 °C-on (vagy egy éjszakán keresztül 4 °C-on).

A standardok elkészítése

Egy 12 x 75 mm-es, boroszilikát üvegből készült egyszer használatos kémcsőben keverjünk össze 5,8 µl tisztított VTG standardot 1,5 ml vizsgálati pufferrel. Ezzel egy 12 760 ng/ml koncentrációjú keveréket állítunk elő. Ezután hígítási sorozatot készítünk úgy, hogy az előző hígításból 750 µl mennyiséget hozzáadunk 750 µl mennyiségű vizsgálati pufferhez, így megkapjuk a következő végső koncentráció-értékeket: 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 és 50 ng/ml.

A minták előkészítése

Elsőként hígítsuk a vérplazmát a vizsgálati pufferrel 1: 300 (pl. 1 µl plazma és 299 µl vizsgálati puffer összekeverésével) vagy 1: 30 arányban. Ha várhatólag nagy mennyiségű VTG-t kapunk, további vagy nagyobb arányú hígításokra lehet szükség. Törekedjünk arra, hogy a B/B_o belül maradjon a standardok tartományán. Azoknál a mintáknál, amelyeknél nem értékelhető a VTG-szint, pl. kontrollként szolgáló ivaréretlen hímeknél és nőstényeknél, érdemes 1: 30 arányú hígítást használni. Az ennél kisebb arányú hígítások esetén nem kívánt mátrixhatások léphetnek fel.

Emellett ajánlatos minden lemezzel párhuzamosan pozitív kontrollmintát futtatni. A kontrollminta olyan plazmaállományból származik, amely nagy mennyiségű indukált VTG-t tartalmaz. A plazmaállományt először normál kecske szérummal hígítják, alikvotokba osztják és –80 °C-on tárolják. Minden lemezhez felolvasztanak egy alikvotot, felhígítják a vizsgálati pufferrel és a vizsgálati mintával azonos körülmények között vizsgálják.

▼M8

Inkubálás az 1. ellenanyaggal

Az 1. ellenanyag elkészítéshez az előadszorbeált 1. ellenanyag szérumot 1: 2000 arányban hígítják a vizsgálati pufferrel (pl. 8 µl mennyiséget hígítanak 16 ml vizsgálati pufferrel). Egy üveg csőben keverjünk össze 300 µl 1. ellenanyag oldatot 300 µl mintával/standarddal. Készítsük el hasonlóképpen a B_o csövet, 300 µl vizsgálati puffert összekeverve 300 µl ellenanyaggal. Ezenfelül egy normál kecske szérumot tartalmazó csövet is kell készítenünk, csak 600 µl vizsgálati pufferrel, vagyis ellenanyag nélkül. Fedjük le a csöveket Parafilm zárófóliával, majd örvénykeverővel óvatosan elegyítsük tartalmukat. Inkubáljuk a csöveket 37 °C-os vízfürdőben 1 órán keresztül.

A lemez mosása

Közvetlenül az 1. ellenanyag inkubálásának vége előtt mossuk ki a lemezt. Ehhez rázzuk ki a tartalmát és nedvszívó papírral töröljük szárazra. Ezt követően töltsük fel a lyukakat 350 µl mosóoldattal, majd öntsük ki az oldatot, és töröljük szárazra a lyukakat. Jó szolgálatot tehet egy többcsatornás ismétlőpipetta vagy lemezmosó. A mosási műveletet kétszer megismételjük, mert összesen háromszor kell kimosnunk a lemezt.

A lemez feltöltése

Miután elmostuk a lemezt, óvatosan távolítsuk el a csöveket a vízfürdőből és az örvénykeverőből. Minden mintát, standardot, B_o-t és NSB-t tartalmazó csőből öntsünk 200 µl-t a lemez két-két lyukába. Takarjuk le a lemezt tapadós zárófóliával, és inkubáljuk 1 órán keresztül 37 °C-on.

Inkubálás a 2. ellenanyaggal

Az előző lépésben végrehajtott inkubálás végén a lemezt a fentiekhez hasonlóan ismét háromszor el kell mosni. A 2. ellenanyag hígításához keverjünk össze 2,5 µl 2. ellenanyagot 50 ml vizsgálati pufferrel. A hígított 2. ellenanyagból töltsünk 200 µl-t az egyes lyukakba, majd a lemezt a fentiekben leírtak szerint zárjuk le és inkubáljuk 1 órán át 37 °C-on.

A szubsztrát hozzáadása

A 2. ellenanyag inkubálását követően mossuk ki háromszor a lemezt a fentiek szerint. Ezután minden lyukhoz adjunk hozzá 100 µl TMB szubszrátot. Ezt követően 10 percig hagyjuk a reakciót végbemenni, lehetőleg erős fénytől védett helyen. Majd 100 µl 1 M koncentrációjú foszforsav hozzáadásával állítsuk le a reakciót. Ezáltal a keverék színe kékről élénksárgára változik. Egy lemezleolvasóval mérjük meg az abszorbanciát 450 nm-en.

A B/B_o kiszámítása

Minden mérési eredményből vonjuk ki az NSB átlagértékét. Az egyes minták és standardok B/B_o arányának kiszámításához osszuk el az abszorbancia értékét (B) a B_o minta átlagos abszorbanciájával.

A standard görbe létrehozása és az ismeretlen mennyiségek meghatározása

Számítógépes grafikai szoftver (pl. Slidewrite™ vagy Sigma Plot®) segítségével hozzunk létre egy standard görbét, amely a standardok B/B_o aránya alapján extrapolálja a minta B/B_o arányából származó mennyiséget. A szóban forgó mennyiség jellemzően egy logaritmikus skálán jelenik meg, a görbe pedig szigmoid formájú. A standardok szűk tartománya esetén azonban a görbe lineáris formát vehet fel. Igazítsuk ki a mintára kapott mennyiséget a hígítási tényezővel, és mg VTG/ml plazma arányban tüntessük fel a jelentésben.

A minimális kimutathatósági határértékek (MDL) megállapítása

Különösen a normál fejlődésű hímeknél gyakran nem világos, hogyan szerepeljenek a jelentésben az alacsony értékekből származó eredmények. Ilyen esetben a 95 %-os „konfidenciahatárok” alkalmazásával kell meghatározni, hogy az értéket nullaként vagy valamely más számként kell-e feltüntetni. Amennyiben a minta eredménye a nulla standard (B_o) konfidenciaintervallumán belül

▼M8

van, akkor az értéket nullaként kell feltüntetni. A minimális kimutathatósági szint az a legalacsonyabb standard, amelyik következetesen eltér a nulla standardtól; vagyis a két konfidenciaintervallum között nincs átfedés. A minta azon eredményei esetében, amelyek a minimális kimutathatósági szint konfidenciahatárán belül vagy azon felül helyezkednek el, a kiszámított értéket kell feltüntetni a jelentésben. Ha pedig a minta eredménye a nulla standard és a minimális kimutathatósági szint konfidenciaintervallumai közé esik, az adott minta értéke a minimális kimutathatósági szint feleként kerül bele a jelentésbe.

SZAKIRODALOM

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

▼M8

7. függelék

STATISZTIKAI ELEMZÉS

A LAGDA során három statisztikai elemzésnek alávetett adattípus keletkezik: (1) kvantitatív folytonos adatok, (2) a fejlődési ütemre vonatkozó, „eseményig eltelt időt” jelző adatok (az NF szerinti 62. stádium eléréséig eltelt idő) és (3) a kórszövettani vizsgálatokból származó sorrendi adatok, azaz a súlyossági pontszámok és a fejlődési stádiumok. Az 1. ábrán látható a LAGDA javasolt statisztikai elemzési folyamatábrája. Az alábbi rész pedig néhány magyarázattal szolgál, amelyek szükségesek lehetnek a LAGDA mérési eredményeinek statisztikai elemzéséhez. Az elemzési folyamatábra alapján a mortalitás, a növekedés (testtömeg és testhossz) és a hepato-szomatikus index (LSI) mérési eredményeit a „Más végpontok” elágazás szerint kell elemezni.

Folytonos adatok

A folytonos végpontokra vonatkozó adatok esetében először ellenőrzik a monotonitást, ehhez rangsorba rendezik az adatokat, beillesztik őket egy ANOVA-modellbe, majd összevetik a lineáris és kvadratikus kontrasztokat. Monoton jellegű adatoknál egy lefelé lépegető Jonckheere–Terpstra-féle trendpróbát kell végezni az ismétlések középértékein, és további elemzésekre nincs szükség. A normál eloszlású, homogén szórással rendelkező adatok elemezhetők a lefelé lépegető Williams-próbával is. Ha azonban az adatok nem monoton jellegűek (vagyis a kvadratikus kontraszt szignifikáns, a lineáris kontraszt pedig nem az), akkor elemzésükhöz kombinált hatásokat mérő ANOVA-modellt kell használni. Ezt követően meg kell vizsgálni az adatok normalitását (lehetőleg a Shapiro–Wilk- vagy az Anderson–Darling-próba alkalmazásával) és szóráshomogenitását (lehetőleg a Levene-féle próba használatával). Mindkét próbát a kombinált hatásokat mérő ANOVA-modell maradékain végzik. Ezeket a formális normalitási és szóráshomogenitási próbákat a szakértői megítélés is helyettesítheti, de a formális próbákat kell előnyben részesíteni. Ha az adatok normál eloszlásúak homogén szórással, akkor a kombinált hatásokat mérő ANOVA feltételezései beigazolódnak, és a szignifikáns kezelési hatást a Dunnett-féle próbával határozzák meg. Normálistól eltérő eloszlás vagy szórásheterogenitás esetén a Dunnett-féle próba feltételezései nem teljesülnek, és normalizáló vagy szórásstabilizáló transzformációt kell keresni. Ha nem találnak ilyen transzformációt, a szignifikáns kezelési hatást a Dunn-féle próbával határozzák meg. A lehetőségekhez mérten nem kétoldalú, hanem egyoldalú vizsgálatot kell végezni, de szakértői megítélés alapján kell dönteni arról, hogy egy adott végpont esetén melyik vizsgálat a helyénvaló.

Mortalitás

A mortalitási adatokat a vizsgálat teljes időtartamára vonatkozólag elemezni kell, és a mortalitást az egyes tartályokban elpusztult állatok arányában kell kifejezni. Azoknak az ebihalaknak az adatait, amelyek nem alakultak át teljesen az adott időkereten belül, illetve amelyeket felhasználtak a lárva szakaszban zajló mintavételhez, továbbá a kiselejtezett növendék békák és a kísérletet végző személy hibájából elpusztult állatok adatait cenzúrázott adatoknak kell tekinteni, és figyelmen kívül kell hagyni az arányszám nevezőjének meghatározásakor. Mielőtt statisztikai elemzésekre kerülne sor, a mortalitási arányszámokon négyzetgyök arkusz transzformációt kell végezni. Alternatív megoldásként a lefelé lépegető Cochran–Armitage-féle próba használható, ha az eloszlás túlbecsült, akkor lehetőleg annak Rao–Scott-féle módosítását kell alkalmazni.

Testtömeg és testhossz (növekedési adatok)

Mivel az átalakulás során a hímek és a nőstények nem mutatnak ivari kétalakúságot, a lárva részminták növekedési adatait ivartól függetlenül elemzik. A növendékek növekedési adatait azonban genetikai ivar szerint elkülönítve kell elemezni. Előfordulhat, hogy e végpontok adatain logaritmus transzformációt kell alkalmazni, miután a méretre vonatkozó adatok eloszlása gyakran követi a lognormális eloszlást.

▼M8

Hepato-szomatikus index (LSI)

A máj tömegére vonatkozó adatokat a teljes testtömeg arányához viszonyítva normalizálni kell (vagyis meg kell határozni az LSI-t), és genetikai ivar szerint elkülönítve kell elemezni.

Az NF szerinti 62. stádiumig eltelt idő

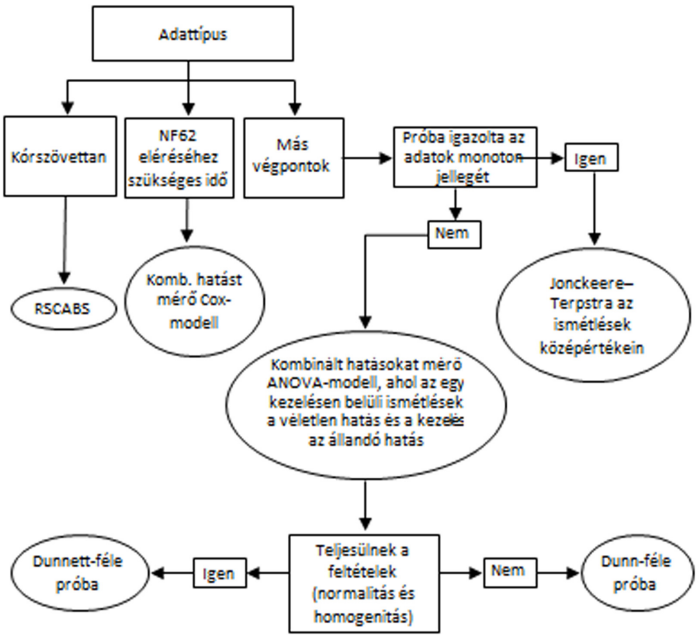
Az átalakulásig eltelt időre vonatkozó adatokat „eseményig eltelt időt” jelző adatként kell kezelni, és az elemzésből ki kell zárni az elhullott, valamint azon egyedek adatait, amelyek nem érték el 70 napon belül az NF szerinti 62. stádiumot (ezek a felső határt túllépő adatok, vagyis a valós érték nagyobb mint 70 nap, de a vizsgálat véget ér, mielőtt az állat 70 napon belül elérte volna az NF szerinti 62. stádiumot). A vizsgálat lezárásának napját a hígítóvizes kontrollokban az NF szerinti 62. stádium (vagyis az átalakulás végének) eléréséhez szükséges átlagos időtartam alapján kell meghatározni. A teljes átalakuláshoz szükséges átlagos időtartam megállapítható a terméket és határértéket vizsgáló Kaplan–Meierx becsléssel. Ezeket a végpontokat a kombinált hatásokat mérő Cox-féle arányos kockázati modellel kell elemezni, amely figyelembe veszi a vizsgálat ismétléseinek számát.

Kórszövettani adatok (súlyossági pontszámok és a fejlődési stádiumok)

Kórszövettani adatok súlyossági pontszámok vagy fejlődési stádiumok formájában állnak rendelkezésre. Az úgynevezett RSCABS (Rao–Scott Cochran–Armitage by Slices) próba a Cochran–Armitage-féle trendpróba Rao–Scott-féle lefelé lépegető módosítását alkalmazza a kórszövettani válaszreakció minden súlyossági szintjén (Green és munkatársai, 2014). A Rao–Scott-féle módosítás a próba során figyelembe veszi az edények (ismétlések) kísérleti kialakítását. A „by Slices” eljárás számításba veszi azt a biológiai elvárást, hogy a dózisok vagy koncentrációk növelésével párhuzamosan nő a hatás súlyossága, ugyanakkor megtartja az egyedi pontszámokat és meghatározza a kimutatott hatások súlyosságát. Az RSCABS eljárás nem csupán azt határozza meg, hogy melyik kezelés különbözik statisztikailag a kontrolloktól, (vagyis melyik mutat súlyosabb patológiai elváltozásokat, mint a kontrollok), hanem azt is megállapítja, hogy melyik súlyossági pontszámnál fordul elő eltérés, újabb összefüggéseket tárva fel az elemzés számára. Az ivarmirigyek és a reproduktív vezetékek fejlődési stádiumba sorolása tekintetében az adatok további feldolgozására van szükség, mivel az RSCABS egyik feltételezése, hogy a dózissal párhuzamosan nő a hatás súlyossága. A megfigyelt hatás a késleltetett vagy a felgyorsult fejlődés. Ezért a fejlődési stádiumba sorolásra vonatkozó adatok elemezhetők a jelentés szerint a felgyorsult fejlődés észleléséhez, majd a második, a késleltetett fejlődés detektálásához manuálisan invertálni kell az adatokat.

1. ábra

A LAGDA során nyert adatok statisztikai elemzésének folyamatábrája.



▼**M8**

SZAKIRODALOM

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1 108-1 116.

▼M8

8. függelék

SZEMPONTOK A GERINCFERDÜLÉS ELŐFORDULÁSÁNAK NYOMON KÖVETÉSÉHEZ ÉS MINIMALIZÁLÁSÁHOZ

Az idiopátiás gerincferdülés, amely a *Xenopus laevis* ebihalaknál többnyire a farok elhajlásában nyilvánul meg, megnehezítheti a vizsgált populáció morfológiájának és viselkedésének megfigyelését. Erőfeszítéseket kell tenni annak érdekében, hogy mind a törzsállományban, mint a vizsgálati körülmények közepette minimalizálják vagy teljesen visszaszorítsák a gerincferdülés előfordulását. A végleges vizsgálat során ajánlatos a mérsékelt és a súlyos gerincferdülés gyakoriságát 10 % alatt tartani, hogy a vizsgálat megbízhatóbban észlelje a kezeléssel összefüggő fejlődési hatásokat az egyébként egészséges kétéltű lárvákban.

A végleges vizsgálat alatt tett napi megfigyelések során fel kell jegyezni az észlelt gerincferdüléses esetek előfordulását (egyedenként számlálva) és súlyosságát. A rendellenesség természetét jellemezni kell előfordulási helyével (pl. a farok elülső vagy hátsó vége) és a görbület irányával (laterális vagy dorziventrális). A súlyosság osztályozható az alábbiak szerint:

(NR) Nem észrevehető: nem látható görbület

1. Enyhe:: csekély mértékű, laterális görbület a farok hátsó részén; csak nyugalmi állapotban észlelhető.

2 Mérsékelt: .laterális görbület a farok hátsó részén; mindenkor észlelhető, de nem akadályozza a mozgást

3. Súlyos: laterális görbület a farok elülső részén; VAGY a mozgást akadályozó bármely görbület; VAGY bármely dorziventrális görbület

Az US EPA FIFRA Tudományos Tanácsadó Testülete (FIFRA SAP 2013) áttekintette tizenöt, (NF szerinti 51–60+ stádiumban lévő) *X. laevis* egyedeken lefolytatott kétéltű-átalakulási vizsgálatból származó, gerincferdülésre vonatkozó összefoglaló adatokat, és általános ajánlásokat fogalmazott meg arra nézve, hogyan lehet csökkenteni e rendellenesség előfordulását a vizsgált populációban. Az ajánlások a LAGDA szempontjából is relevánsak, bár ez a vizsgálat hosszabb fejlődési szakaszt foglal magában.

Korábbi ívási teljesítmény

Általános elvként jó minőségű, egészséges felnőttekből kell kialakítani a tenyészpárokat; a gerincferdüléses utódokat termelő tenyészpárok eltávolítása minimalizálhatja a gerincferdülés későbbi előfordulását. Kifejezetten a vadon befogott tenyészállomány használatának visszaszorítása bizonyulhat előnyösnek. A LAGDA expozíciós időszaka az NF szerinti 8–10. stádiumban lévő embriókkal veszi kezdetét, és a vizsgálat elején nem állapítható meg, hogy az adott egyedeknél előfordul-e majd gerincferdülés. Amellett tehát, hogy a vizsgálatba felvett állatoknál nyomon követik a gerincferdülés előfordulását, dokumentálni kell a generáció korábbi teljesítményét is (azon belül a gerincferdülés fejlődő lárváknál tapasztalt gyakoriságát). Hasznos lehet az egyes generációk vizsgálatból kimaradt egyedeinek további nyomon követése, és a megfigyelések belefoglalása a jelentésbe (FIFRA SAP 2013).

Vízminőség

Fontos biztosítani a megfelelő vízminőséget, a laboratóriumi törzsállományban és a vizsgálat alatt egyaránt. A vízi toxicitási vizsgálatokban rutinszerűen értékelt vízminőségi kritériumokon túl hasznos lehet nyomon követni és kiküszöbölni a tápanyaghiányt (pl. a C-vitamin, a kalcium és a foszfor hiányát), valamint a szelén és a réz túlzott előfordulását, ami a beszámolók szerint különböző súlyosságú gerincferdülést okozott a laboratóriumban nevelt *Rana* sp. és *Xenopus* sp. fajoknál (Marshall és munkatársai 1980; Leibovitz és munkatársai 1992; Martinez és munkatársai 1992; a FIFRA SAP 2013 jelentése szerint). A megfelelő étrend biztosítása (lásd a 4. függeléket) és a tartály rendszeres tisztítása általában javítja a vízminőséget és a vizsgált egyedek egészségét.

▼M8

Étrend

A 4. függelék részletesen ismerteti a LAGDA során sikeresnek bizonyult étrendre vonatkozó konkrét ajánlásokat. Javasolt ellenőrizni, hogy a táplálékforrások nem tartalmaznak-e biotoxinokat, gyomirtó szereket és egyéb növényvédő szereket, amelyről ismert, hogy az *X. laevis* egyedekben és más vízi állatokban gerincferdülést okoznak (Schlenk és Jenkins 2013). Bizonyos kolinészteráz-gátlókkal szembeni kitettséget például összefüggésbe hozták a halaknál (Schultz és munkatársai 1985) és a békáknál (Bacchetta és munkatársai 2008) megfigyelt gerincferdüléssel.

SZAKIRODALOM

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.